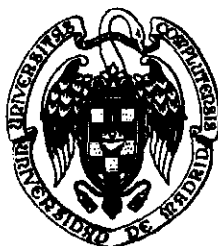


**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Dpto. de BIOQUÍMICA  
Y  
BIOLOGÍA MOLECULAR**



**ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA  
CITOTOXINA  $\alpha$ -SARCINA**



*Mancha*

*H. Ochoa*  
Fdo. Herodes Ochoa

**TESIS DOCTORAL**

**JOSE MIGUEL MANCHEÑO GÓMEZ**

**Madrid, Enero de 1995**

INDICE . . . . .	I
ABREVIATURAS . . . . .	1
INTRODUCCION . . . . .	2
ANTECEDENTES BASICOS ACERCA DE LA $\alpha$ -SARCINA . . . . .	3
Su descubrimiento y caracterización funcional . . . . .	3
Su estructura . . . . .	4
Su producción como proteína recombinante . . . . .	5
Su interacción con vesículas modelo . . . . .	7
Su citotoxicidad . . . . .	9
INFORMACION ADICIONAL . . . . .	10
TRANSLOCACION DE TOXINAS PROTEICAS CON DIA- NAS INTRACELULARES A TRAVES DE MEMBRANAS . . . . .	10
Mecanismo de acción de la toxina de la difteria . . . . .	10
Mecanismo de acción de la exotoxina A de <i>Pseudomo-         nas aeruginosa</i> . . . . .	12
Ricina: modelo de proteína inactivante de ribosomas . . . . .	13
REQUISITOS ESTRUCTURALES PARA LA TRANSLOCA- CION DE PROTEINAS A TRAVES DE MEMBRANAS EN SISTEMAS CELULARES . . . . .	15
Relaciones estructura-función en la translocación de pro- teínas tóxicas a través de membranas . . . . .	16
FUSION DE MEMBRANAS . . . . .	18
OBJETIVOS . . . . .	21
PARTE EXPERIMENTAL . . . . .	23
Materiales . . . . .	24
Purificación de la $\alpha$ -sarcina . . . . .	24
Espectros de absorción en la región UV-visible . . . . .	24
Espectros de dicroísmo circular . . . . .	25
Espectros de fluorescencia . . . . .	25
Medidas de polarización de fluorescencia . . . . .	25
Espectros de absorción en el infrarrojo . . . . .	25
Formación de vesículas de fosfolípidos . . . . .	26
Ensayos de unión proteína-vesícula . . . . .	26
Ensayos de agregación de vesículas . . . . .	26
Ensayos de mezcla de lípidos . . . . .	27
Estudios de permeabilidad de membrana . . . . .	28

Ensayos de mezcla de contenidos acuosos . . . . .	29
Medidas de dispersión de luz a 90° mediante técnicas de flujo detenido . . . . .	29
Calorimetría diferencial de barrido . . . . .	31
Encapsulación de tripsina en vesículas de fosfolípidos . . . . .	32
Digestión trípica intravesicular de $\alpha$ -sarcina . . . . .	32
Encapsulación de tRNA en vesículas de fosfolípidos . . . . .	32
Degradación de tRNA encapsulado por $\alpha$ -sarcina . . . . .	33
Fotomarcage de $\alpha$ -sarcina . . . . .	33
Microscopía electrónica . . . . .	33
Reducción y carboxiamidometilación de $\alpha$ -sarcina . . . . .	34
Análisis de aminoácidos . . . . .	34
Digestiones proteolíticas . . . . .	34
Ensayo de actividad ribonucleasa de la $\alpha$ -sarcina . . . . .	34
Alineamiento y comparaciones de secuencias de aminoácidos. Predicción de estructuras secundarias . . . . .	35
Determinación de los contenidos de estructura secundaria a par- tir de los espectros de CD y de FTIR . . . . .	35
Síntesis y purificación del péptido $\alpha$ S(116-139) . . . . .	36
 RESULTADOS Y DISCUSION . . . . .	 37
 1. Agregación y mezcla de lípidos de vesículas de dimiristoilfosfatidil- serina por $\alpha$ -sarcina . . . . .	 38
Unión de $\alpha$ -sarcina a vesículas compuestas por DMPS . . . . .	38
Agregación de vesículas de DMPS por $\alpha$ -sarcina . . . . .	39
Efecto de la $\alpha$ -sarcina sobre el comportamiento termotrópico de DMPS . . . . .	42
Discusión . . . . .	46
 2. Translocación de $\alpha$ -sarcina a través de la bicapa lipídica de vesícu- las de asolectina . . . . .	 53
Fotomarcage hidrofóbico de la $\alpha$ -sarcina . . . . .	53
Degradación de tRNA encapsulado . . . . .	55
Digestión de $\alpha$ -sarcina por tripsina intravesicular . . . . .	57
Discusión . . . . .	58
 3. Predicción de la conformación de la proteína $\alpha$ -sarcina: modelo es- tructural para explicar la interacción $\alpha$ -sarcina-membranas . . . . .	 62
Resultados . . . . .	62
Discusión . . . . .	70
 4. Estudio cinético de la agregación y mezcla de lípidos de vesículas de PG y PS producidas por $\alpha$ -sarcina: medidas de dispersión de luz median- te técnicas de flujo detenido y medidas de transferencia de energía de fluorescencia . . . . .	 74

Medida de las velocidades iniciales de agregación de vesículas por técnicas de flujo detenido . . . . .	74
Medidas de las velocidades de mezcla de lípidos por transferencia de energía por resonancia . . . . .	77
Discusión . . . . .	83
5. Caracterización espectroscópica de la $\alpha$ -sarcina reducida y carboxiamidometilada. Análisis de los requerimientos estructurales para la interacción hidrofóbica con bicapas lipídicas . . . . .	89
Caracterización espectroscópica de la $\alpha$ -sarcina reducida y carboxiamidometilada . . . . .	89
El trifluoroetanol promueve una conformación en la $\alpha$ -SRC espectroscópicamente similar a la adquirida por la $\alpha$ -sarcina nativa . . .	92
La $\alpha$ -SRC interacciona con vesículas compuestas por fosfolípidos ácidos . . . . .	94
Los residuos de triptófano de la $\alpha$ -SRC se transfieren a un medio de menor polaridad tras interactuar con vesículas de fosfolípidos . . . . .	98
La $\alpha$ -sarcina nativa y la $\alpha$ -SRC muestran diferentes conformaciones tras la interacción con bicapas lipídicas. Estudios de espectroscopía de infrarrojo . . . . .	100
Discusión . . . . .	100
6. Desnaturalización térmica de la $\alpha$ -sarcina: desestabilización de la proteína inducida por la unión a membranas . . . . .	105
Estudios de la desnaturalización de la $\alpha$ -sarcina mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) . . . . .	105
Estudios de la desnaturalización térmica de la $\alpha$ -sarcina mediante espectroscopía de infrarrojo . . . . .	109
Estudios de la desnaturalización térmica de la $\alpha$ -sarcina mediante espectroscopía de fluorescencia . . . . .	114
Discusión . . . . .	115
7. Interacción con membranas del péptido sintético $\alpha$ S(116-139) correspondiente a la región (116-139) de la secuencia de la $\alpha$ -sarcina . . . . .	120
Caracterización espectroscópica del péptido sintético $\alpha$ S(116-139) .	120
Interacción del péptido $\alpha$ S(116-139) con vesículas de fosfolípidos .	122
Cambios conformacionales del péptido $\alpha$ S(116-139) inducidos por la interacción con vesículas lipídicas . . . . .	129
Discusión . . . . .	129
CONCLUSIONES . . . . .	134
BIBLIOGRAFIA . . . . .	136

<b>ANT</b>	antraceno
<b>ANTS</b>	ácido 1-aminonaftaleno-3,6,8-trisulfónico
<b>BSA</b>	albúmina de suero bovino
<b>CD</b>	dicroísmo circular
<b>DMPG</b>	dimiristoilfosfatidilglicerol
<b>DMPS</b>	dimiristoilfosfatidilserina
<b>DOPG</b>	dioleilfosfatidilglicerol
<b>DPH</b>	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
<b>DPX</b>	bromuro de N,N'- <i>p</i> -xililen-bis piridinio
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>%ET</b>	porcentaje de transferencia de energía por resonancia
<b>FT-IR</b>	infrarrojo por transformada de Fourier
<b>NBD-PE</b>	N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)-dimiristoilfosfatidiletanolamina
<b>PA</b>	ácido fosfatídico
<b>PAGE-SDS</b>	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
<b>PC</b>	fosfatidilcolina
<b>PC-I</b>	1-palmitoil-2-(2-azido-4-nitrobenzoil)- <i>sn</i> -glicero-3-[ <sup>3</sup> H]fosfocolina
<b>PC-II</b>	1-miristoil-2-[12-(4-azido-2-nitrofenil)amino]dodecanoil- <i>sn</i> -glicero-3-[ <sup>14</sup> C]-fosfocolina
<b>PE</b>	fosfatidiletanolamina
<b>PG</b>	fosfatidilglicerol
<b>PI</b>	fosfatidilinositol
<b>PS</b>	fosfatidilserina
<b>Rh-PE</b>	N-(7-lisamina rodamina B sulfonil)-diacilfosfatidiletanolamina
<b>SDS</b>	dodecilsulfato sódico
<b>TFE</b>	trifluoroetanol
<b>TMA-DPH</b>	1-(4(trimetilamino)fenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno
<b>TPCK</b>	tosil-fenil-clorometilcetona
<b>UV-VIS</b>	ultravioleta-visible
<b>αSRC</b>	α-sarcina reducida y carboxiamidometilada
<b>ΔH</b>	incremento de entalpía

# INTRODUCCION

## ANTECEDENTES BASICOS ACERCA DE LA $\alpha$ -SARCINA

### Su descubrimiento y caracterización funcional

La  $\alpha$ -sarcina es una proteína secretada por el hongo *Aspergillus giganteus* MDH 18894, que fue inicialmente detectada durante un programa de búsqueda de agentes antibióticos-antitumorales llevado a cabo por el Departamento de la Salud de Michigan (Olson y Goerner, 1965; Olson *et al.*, 1965). Esta proteína resultó muy eficaz en la inhibición del crecimiento de diferentes tumores inducidos en animales (Olson y Goerner, 1965; Olson *et al.*, 1965; Goldin *et al.*, 1966), como el sarcoma 180 y carcinoma 755 de acuerdo con la nomenclatura original. Su nombre hace referencia precisamente a sus propiedades antisarcoma. A pesar de su actividad antitumoral, el uso terapéutico de la  $\alpha$ -sarcina no resulta clínicamente satisfactorio debido a su elevada citotoxicidad, cuya base molecular se relacionó posteriormente con la inhibición de la síntesis de proteínas (Roga *et al.*, 1971; Fernández-Puentes y Vázquez, 1977; Conde *et al.*, 1978; Hobden y Cundliffe, 1978; Schindler y Davies, 1977; Endo y Wool, 1982). La  $\alpha$ -sarcina inactiva ribosomas eucarióticos por la hidrólisis de un único enlace fosfodiéster entre las bases G4325 y A4326 de la molécula de rRNA 28S, localizado en una región muy conservada evolutivamente (Brosins *et al.*, 1980; Endo y Wool, 1982; Endo *et al.*, 1983; Wool, 1984; Wool *et al.*, 1990). Esta actividad ribonucleasa ha resultado muy útil en estudios sobre la estructura del ribosoma (Wool, 1984; Wool *et al.*, 1990; Wool *et al.*, 1992).

Estudios acerca de los efectos de la  $\alpha$ -sarcina sobre sistemas celulares parecieron revelar que la proteína sólo muestra citotoxicidad contra células infectadas por virus (Fernández-Puentes, 1980; Carrasco y Esteban, 1982; Muñoz *et al.*, 1985; Otero y Carrasco, 1987). El tratamiento con algunos ionóforos (Alonso y Carrasco, 1981; Alonso y Carrasco, 1982; Otero y Carrasco, 1987), con fosfolipasa C (Otero y Carrasco, 1988) o con ATP extracelular (Otero y Carrasco, 1986) produce una permeabilización de las células de mamífero a la  $\alpha$ -sarcina. Por estas razones, la  $\alpha$ -sarcina fue considerada un inhibidor de la biosíntesis de proteínas en sistemas libres de células o bien en sistemas de células previamente permeabilizadas. En este bloque de estudios la  $\alpha$ -sarcina fue empleada como sonda para comprobar el estado de permeabilización de las membranas, puesto que no se encontró ningún receptor de membrana propio de la proteína.

Hoy día la  $\alpha$ -sarcina se considera una proteína inactivante de ribosomas (RIP) de tipo I (D'Alessio *et al.*, 1991). Este grupo de proteínas se caracteriza por su capacidad de inactivar catalíticamente los ribosomas, con la consiguiente inhibición de la síntesis de proteínas (Stirpe *et al.*, 1992). Así, tal y como otras RIP, la  $\alpha$ -sarcina se ha empleado

recientemente para la preparación de inmunotoxinas, en donde la toxicidad de la proteína se acopla a la especificidad de un anticuerpo frente a un determinado antígeno (Wawrzyn-czak *et al.*, 1991; Pastan *et al.*, 1992).

Las capacidades demostradas por la  $\alpha$ -sarcina tienen obviamente un soporte estructural. En este sentido, la secuencia de aminoácidos de la  $\alpha$ -sarcina se determinó en 1983 (Sacco *et al.*, 1983), observándose un alto grado de similitud con la secuencia de la ribonucleasa (RNasa) U<sub>2</sub> de *Ustilago sphaerogena* (Sato y Uchida, 1975). Aunque ambas proteínas muestran actividad ribonucleolítica, difieren en cuanto a la especificidad de sustrato (la  $\alpha$ -sarcina hidroliza un único enlace fosfodiéster en el ribosoma, mientras que la RNasa U<sub>2</sub> digiere extensivamente el RNA) y en cuanto a la capacidad de entrar en células (la RNasa U<sub>2</sub> no posee tal capacidad).

### Su estructura

La  $\alpha$ -sarcina se compone de una cadena polipeptídica de 150 aminoácidos (Sacco *et al.*, 1983). Es una proteína de carácter básico, que contiene entre otros 20 residuos de lisina, 4 argininas, 8 histidinas, 11 residuos de ácido aspártico y 6 de ácido glutámico. Por lo tanto, aproximadamente un 30% de los residuos son cargados, mientras que otro 40% son residuos polares sin carga. La  $\alpha$ -sarcina ha de considerarse por todo ello como una proteína altamente polar. Este hecho queda reflejado en el perfil de hidropatía, en donde la mayor parte de la cadena polipeptídica exhibe un carácter expuesto (Martínez del Pozo *et al.*, 1988). Es de destacar que no se observan segmentos de la secuencia que puedan considerarse potencialmente implicados en interacciones hidrofóbicas con membranas (Sacco *et al.*, 1983). Solamente tres regiones de la proteína, los segmentos comprendidos entre los residuos 1-6, 95-100 y 120-140, presentan valores de hidropatía que pueden sugerir cierto carácter no expuesto. Dos de estas regiones se encuentran conectadas mediante un puente disulfuro. De hecho, uno de los dos puentes disulfuro que posee la  $\alpha$ -sarcina (el que aparece entre los residuos de cisteína 6 y 148) acerca espacialmente a los extremos amino y carboxilo terminales (Sacco *et al.*, 1983).

La  $\alpha$ -sarcina contiene 8 residuos de tirosina. Experimentos de titulación llevados a cabo midiendo la absorción a 295 nm del ion tirosinato, revelan que seis tirosinas presentan un pK de 10.2, mientras que el resto vienen caracterizadas por un pK de 11.4. Según esto, los seis primeros residuos de tirosina poseerían un mayor grado de exposición que el resto (Martínez del Pozo *et al.*, 1988).

La proteína exhibe cinco transiciones inducidas por pH, según se deriva de estudios



de espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular (CD) (Martínez del Pozo *et al.*, 1988). Las transiciones que se producen a pH 2.5 y a 10.2 son transiciones desnaturalizantes, de acuerdo con las medidas de CD en el ultravioleta lejano. La transición detectada a pH 11.4 ha sido relacionada con la ionización de residuos de tirosina con un bajo grado de exposición. La transición observada a pH 4.5 se ha asignado a la protonación de grupos carboxilo adyacentes a los residuos de tirosina, ya que es solamente la emisión de fluorescencia de este fluoróforo la que resulta afectada en esta transición. La ausencia de cambios en la señal de dicroísmo, tanto en el ultravioleta lejano como en el cercano, en esta transición apunta hacia el carácter local de la misma. Finalmente, la transición detectada a pH 8.0, tanto por espectroscopía de fluorescencia como por CD se ha relacionado con la desprotonación del grupo  $\alpha$ -amino de la proteína. En este sentido, cabe destacar el hecho de que uno de los dos residuos de triptófano de la proteína está localizado en la posición 4 de la cadena polipeptídica.

La  $\alpha$ -sarcina es una proteína  $\alpha/\beta$  con un significativo contenido en giros  $\beta$ , según se deduce de los estudios de espectroscopía de infrarrojo y de dicroísmo circular (Gasset *et al.*, 1991b). El trifluoroetanol, agente que promueve la formación de enlaces por puentes de hidrógeno intracatenarios, aumenta el contenido en  $\alpha$ -hélice hasta un 40% (Gasset *et al.*, 1991b). Colato sódico y octilglucósido, ambos detergentes no desnaturalizantes, no producen modificaciones significativas en las propiedades espectroscópicas de la proteína, resultado que está de acuerdo con la baja afinidad que muestran las proteínas hidrosolubles por los detergentes (Tanford, 1980). Detergentes aniónicos, tales como el dodecilsulfato sódico (SDS), producen cambios espectrales en la región del enlace peptídico, cambios que son consistentes con un aumento del contenido en  $\alpha$ -hélice (Gasset *et al.*, 1991b). Cabe decir que estos mismos efectos se han observado sobre otras cadenas polipeptídicas (Jirgensons, 1980).

### **Su producción como proteína recombinante**

La producción de proteínas recombinantes facilita los estudios relativos a las relaciones estructura-función, sobre todo cuando se pueden obtener mutantes dirigidos. En este sentido, ya existen sistemas recombinantes de expresión del gen de la  $\alpha$ -sarcina. La secuencia de nucleótidos de su cDNA, incluyendo la de su péptido señal, apareció en 1990 (Oka *et al.*, 1990), consiguiéndose la producción de  $\alpha$ -sarcina recombinante en *E. coli* dos años más tarde (Oka *et al.*, 1992). El cDNA que codifica para la  $\alpha$ -sarcina sin su residuo N-terminal se ha ligado con la secuencia que codifica para el péptido señal *bla* de la  $\beta$ -lactamasa de *E. coli*, consiguiendo exportarse la proteína al periplasma. Esta construcción, con la que se evita la posible acción tóxica de la proteína sobre los ribosomas del

organismo productor, permite obtener  $\alpha$ -sarcina en un rendimiento de 0.65 mg/l de cultivo. La proteína recombinante obtenida de esta manera resultó ser totalmente activa en cuanto a su capacidad de inactivación de los ribosomas (Oka *et al.*, 1992). El residuo alanina N-terminal, ausente en esta forma recombinante, no resulta por lo tanto esencial para la actividad ribonucleolítica de la proteína, aunque podría ser relevante para las interacciones hidrofóbicas en las que participa la proteína. De hecho, tal y como se ha indicado anteriormente, uno de los tres segmentos más hidrofóbicos de la  $\alpha$ -sarcina resulta ser el comprendido entre los residuos 1-6.

La producción de  $\alpha$ -sarcina recombinante se ha conseguido también mediante el vector de secreción pINIII OmpA2 (Henze *et al.*, 1990; Ghrayeb *et al.*, 1984). En este caso, el gen de la  $\alpha$ -sarcina sintetizado químicamente, se fusionó tras la secuencia que codifica para el péptido señal de la proteína Omp A de *E. coli*. En este sistema, aunque la eliminación del péptido señal era correcta, la proteína recombinante no era liberada al medio extracelular tras un choque osmótico (lo esperable si la proteína hubiera sido exportada al espacio periplásmico), por lo que el rendimiento de producción de la toxina resultó muy bajo (Henze *et al.*, 1990).

Recientemente se ha desarrollado otro sistema de expresión en *E. coli* para la producción de  $\alpha$ -sarcina (Lacadena *et al.*, 1994). Este sistema se basa en la utilización de un vector, el pINPG- $\alpha$ S, muy similar al ya descrito anteriormente (Ghrayeb *et al.*, 1984). En este caso, la construcción codifica para una  $\alpha$ -sarcina con el péptido señal de la Omp A modificado; los residuos Val-18 y Gln-20 del péptido nativo se reemplazaron por Ser y Leu, respectivamente. Este péptido señal modificado supone una mejora considerable en el procesamiento post-traducciona l de las proteínas a las que se encuentra fusionado cuando se las compara con el comportamiento del péptido señal nativo (Henze *et al.*, 1990; Lacadena *et al.*, 1994). La producción de  $\alpha$ -sarcina recombinante se llevó a cabo con cultivos de células de *E. coli* RB791 transformadas con el plásmido anterior, induciéndose su expresión con IPTG 2 mM. Tras una primera centrifugación se procede a la separación de las células del medio. Estas fueron sometidas a choque osmótico y de nuevo centrifugadas; el sobrenadante obtenido tras esta centrifugación se considera la fracción periplásmica. La fracción citoplásmica se obtiene resuspendiendo y sonicando el sedimento de la centrifugación anterior. La  $\alpha$ -sarcina aparece en la fracción soluble, periplásmica e intracelular, purificándose tal y como se ha descrito anteriormente. Aunque la mayor parte de la proteína no se encuentra en forma soluble (Lacadena *et al.*, 1994), el rendimiento final es de 1.5 mg/l de cultivo. Esta proteína recombinante purificada resulta indistinguible a la aislada directamente del hongo, tanto desde el punto de vista estructural como funcional, según los siguientes criterios: composición y secuencia del

extremo amino terminal, movilidad electroforética, comportamiento por HPLC, inmunorreactividad y propiedades espectroscópicas y, finalmente, resulta ser activa en cuanto a su capacidad de inactivación de ribosomas.

### **Su interacción con vesículas modelo**

La  $\alpha$ -sarcina interacciona con vesículas modelo (Gasset *et al.*, 1989, 1990, 1991a, 1991b; Oñaderra *et al.*, 1989, 1993). De la interacción resulta un complejo proteína:lipido que puede ser aislado mediante centrifugación en gradiente de sacarosa (Gasset *et al.*, 1989). La proteína muestra una elevada afinidad por fosfolípidos ácidos, de hecho la constante de disociación es del orden nanomolar. La formación de estos complejos puede seguirse experimentalmente midiendo el aumento de la absorción a 360 nm que se produce tras la adición de  $\alpha$ -sarcina a una suspensión de vesículas lipídicas. Este aumento de la absorción se explica en términos de agregación de vesículas. La extensión de la agregación es dependiente de la relación proteína/lípido, alcanzándose la saturación a una relación molar 50:1 lípido/proteína. La interacción requiere fosfolípidos ácidos para que transcurra. Así, vesículas PG/PC sólo son agregadas cuando el porcentaje de PG (fosfolípido ácido) es superior al 10%. Por lo tanto, la interacción tiene un claro componente electrostático; de hecho, un aumento de la fuerza iónica del medio determina una disminución en la extensión de la agregación.

La interacción de la  $\alpha$ -sarcina con vesículas determina una protección de la proteína frente a la hidrólisis triptica (Gasset *et al.*, 1989; Oñaderra *et al.*, 1989). En presencia de vesículas sólo un 30% de la proteína resulta digerida en condiciones en las que la digestión sería total en ausencia de vesículas. Por lo tanto, la mayor parte de la proteína permanece intacta, de acuerdo con los resultados de análisis electroforético, a pesar del alto contenido en residuos de lisina y arginina.

La agregación de vesículas inducida por  $\alpha$ -sarcina disminuye a medida que el pH del medio aumenta, presentándose una transición caracterizada por un pK de 8.0. Tal como se ha dicho anteriormente, la  $\alpha$ -sarcina muestra una transición conformacional centrada alrededor de este pK (Martínez del Pozo *et al.*, 1988). Esta transición se ha relacionado con la desprotonación del grupo  $\alpha$ -amino, ya que la transición desnaturizante de la proteína, debida a la desprotonación de los residuos de lisina y tirosina, ocurre a pH más elevados (pK 10.2). Ya que parece poco probable que la interacción proteína-vesícula sea mantenida por un único grupo cargado, otras fuerzas deben estar implicadas en este proceso. Aun así, no puede descartarse la participación de ionizaciones de otro tipo de residuos, como por ejemplo, residuos de histidina.

La emisión de fluorescencia, tanto de los residuos de triptófano como de tirosina, resulta incrementarse por la interacción con vesículas, no produciéndose desplazamiento del máximo de emisión. Mientras que la emisión de fluorescencia de los residuos de tirosina no resulta especialmente sensible a la polaridad de su microentorno, la de los residuos de triptófano sí lo es. La ausencia de desplazamientos del máximo de emisión de fluorescencia de la  $\alpha$ -sarcina tras la interacción con vesículas es indicativo de la conservación del microentorno de tales fluoróforos. De esta forma, el aumento en la intensidad de fluorescencia ha sido interpretado como una disminución del apagamiento estático de la proteína, posiblemente por una protección frente a los grupos polarizables responsables de tal apagamiento. La disminución de este apagamiento podría ser producto de interacciones hidrofóbicas (Gasset *et al.*, 1991b).

Los efectos de la  $\alpha$ -sarcina en el comportamiento termotrópico de las vesículas de fosfolípidos se ha interpretado en términos de disminución del número de fosfolípidos implicados en la transición desde la fase gel a líquido cristalino (Gasset *et al.*, 1991a). Estos resultados se han obtenido mediante estudios de calorimetría diferencial de barrido y de anisotropía de la emisión de fluorescencia de vesículas de dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) y dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) marcadas con la sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH). Asimismo, estos resultados sugieren la existencia de un componente hidrofóbico en la interacción, lo cual fue corroborado por experimentos de marcaje con sondas hidrofóbicas fotoactivables. Se han empleado dos sondas diferentes, una de las cuales porta el grupo reactivo fotoactivable a nivel de la cabeza polar de los fosfolípidos, mientras que la otra lo porta a nivel del carbono C<sub>12</sub> de la cadena de ácido graso. La  $\alpha$ -sarcina resulta marcada con ambas sondas, lo cual muestra la accesibilidad de la proteína a tales sondas, esto es, la  $\alpha$ -sarcina penetra al interior hidrofóbico de la bicapa (Gasset *et al.*, 1991a).

La  $\alpha$ -sarcina produce fusión de vesículas lipídicas (Gasset *et al.*, 1990). La mezcla de lípidos de diferentes vesículas se ha detectado midiendo la disminución de la transferencia de energía por resonancia que se produce entre dos sondas fluorescentes incorporadas en una población de vesículas, cuando éstas se incuban con un exceso de vesículas sin marcaje y con  $\alpha$ -sarcina. Esta mezcla de lípidos también se ha detectado observando la formación de vesículas mixtas de DMPG y DPPG, tras la incubación de vesículas de DMPG y vesículas de DPPG con  $\alpha$ -sarcina (Gasset *et al.*, 1990). Estudios de microscopía electrónica por criofractura también muestran la capacidad fusogénica de la  $\alpha$ -sarcina. Tras la incubación de vesículas unilamelares con  $\alpha$ -sarcina aparecen grandes estructuras multilamelares; a una relación saturante 50:1 (lípidos/proteína) se observa la aparición de estructuras planas, indicando que el proceso de fusión probablemente se ha

completado (Gasset *et al.*, 1990).

Finalmente, la  $\alpha$ -sarcina modifica las propiedades de permeabilidad de las vesículas con las que interacciona, induciendo la liberación de calceína encapsulada (Gasset *et al.*, 1990).

### **Su citotoxicidad**

La  $\alpha$ -sarcina posee actividad citotóxica frente a numerosas líneas celulares de tumores humanos (Turnay *et al.*, 1993). La proteína modifica el patrón de proliferación de las células, produciendo inhibición del crecimiento y, finalmente, la muerte celular. Todos estos efectos son consecuencia de la inhibición de la síntesis de proteínas. Esta inhibición se observa tras 18 h de incubación, cuando no aparece daño alguno en la membrana plasmática según se deduce midiendo la liberación de la enzima láctico deshidrogenasa. Tampoco se han detectado variaciones en la actividad mitocondrial.

El análisis cinético de la inhibición de la biosíntesis de proteínas revela una fase de retraso dependiente de la concentración de  $\alpha$ -sarcina. Tras este primer periodo aparece una fase de primer orden con respecto a la concentración de proteína. Todo ello indica la presencia de un componente cinético saturable, previo a la inactivación propiamente dicha. Esta etapa se ha propuesto que es la de paso de la proteína a través de la membrana, ya que no se ha detectado receptor alguno para la  $\alpha$ -sarcina. Todos estos estudios han sido realizados en ausencia de agentes permeabilizantes, por lo que ha de concluirse que la  $\alpha$ -sarcina posee una capacidad intrínseca para penetrar al interior celular.

Los mecanismos de intoxicación celular por toxinas proteicas pueden dividirse en tres etapas: a) unión a la célula, b) inserción en la membrana y, en algunos casos, translocación y, finalmente, c) modificación de su diana. Con respecto a la  $\alpha$ -sarcina, el último aspecto puede explicarse por la actividad ribonucleolítica que demuestra sobre los ribosomas. La primera etapa podría estar relacionada con la elevada afinidad que demuestra la proteína por fosfolípidos ácidos. En este sentido, algunas células tumorales poseen en su monocapa externa un mayor contenido en fosfatidilserina, que las correspondientes células no transformadas (Connor *et al.*, 1989; Utsugi *et al.*, 1991; Zachowski, 1993). Finalmente, la segunda etapa es la peor caracterizada y aunque los resultados anteriores indican que los efectos de la toxina sobre las membranas podrían permitir el paso a su través, no puede descartarse el hecho de que el paso sea por a un proceso de endocitosis.

## INFORMACION ADICIONAL

## TRANSLOCACION DE TOXINAS PROTEICAS CON DIANAS INTRACELULARES A TRAVES DE MEMBRANAS

El mecanismo de intoxicación celular por toxinas proteicas con dianas intracelulares se puede dividir en varias etapas: a) unión a la superficie celular, b) inserción en la membrana y, en algunos casos, translocación a su través y, c) modificación de la diana intracelular. La segunda etapa es la más deficientemente caracterizada y la que supone hoy día un campo de investigación muy intenso (Montecucco *et al.*, 1991). Estas proteínas tóxicas que tras ser secretadas al medio son hidrosolubles, con una estructura terciaria estable, han de insertarse y, en algunos casos translocarse a través de una bicapa lipídica, para alcanzar su diana intracelular. Esto significa que tales proteínas han de sufrir una transición entre una forma hidrosoluble y una forma de membrana (Parker y Pattus, 1993). Esta propiedad la muestran asimismo otros agentes tales como ciertos virus y complejos proteicos implicados en la respuesta inmune tales como proteínas del complemento y perforinas.

Este tipo de toxinas se suele clasificar atendiendo al número de cadenas polipeptídicas que las componen, estableciendo una distinción entre las toxinas monoméricas y las multiméricas. Otro criterio que también se suele considerar es la naturaleza de la diana sobre la que actúan; así, se habla de toxinas con dianas localizadas en la cara citoplasmática de la membrana y de toxinas con dianas libres en el interior celular.

Es característico de las toxinas con dianas intracelulares el hecho de estar compuestas por dos partes funcionalmente diferenciadas que, en muchos casos, vienen representadas por dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro (Olsnes *et al.*, 1993). La cadena enzimáticamente activa se suele denominar A y la implicada en la unión al receptor celular B. A este modelo se ajustan las toxinas proteicas de plantas abrina y ricina (Olsnes y Pihl, 1972a, 1972b), modicina (Refsnes *et al.*, 1977), viscumina (Stirpe *et al.*, 1982) y volkensina (Stirpe *et al.*, 1985). De entre las toxinas de origen bacteriano igualmente tipificadas están la toxina de la difteria de *Corynebacterium diphtheriae* (London, 1992), la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (Pastan *et al.*, 1992), la toxina Shiga de *Shigella* spp. (Brown *et al.*, 1980) y tipo shiga (Endo *et al.*, 1988), la toxina termolábil de *E. coli* (Gill *et al.*, 1981) y las toxinas del tétanos y botulínica (Schiavo *et al.*, 1992). La toxina de la difteria de *Corynebacterium diphtheriae*, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, y la ricina de *Ricinus communis*, son toxinas cuyo mecanismo de acción ha sido caracterizado bioquímica y biofísicamente en buen detalle. Las dos primeras, tras penetrar al interior celular mediante un proceso de endocitosis mediada por receptor, catalizan la ADP-ribosilación del factor de elongación 2 (EF-2), lo cual conduce a su inactivación y la consiguiente inhibición de la síntesis de proteínas (Uchida, 1982). La ricina, merced a la actividad N-glicosidasa de su cadena A actúa sobre los ribosomas determinando su inactivación, conduciendo, por ello, a la inhibición de la síntesis de proteínas.

**Mecanismo de acción de la toxina de la difteria.**

La toxina diftérica es secretada como una única cadena polipeptídica de 535 residuos por células de *Corynebacterium diphtheriae* que han sido previamente

lisogenizadas por bacteriófagos que poseen el gen de la toxina (Greenfield, 1983). Sometiéndola a un tratamiento suave con tripsina y posterior reducción *in vitro* se generan dos fragmentos: el fragmento A (amino terminal, 21 kDa) y el fragmento B (carboxilo terminal, 37 kDa). Una ruptura similar ocurre *in vivo* antes o muy poco después de la unión de la toxina a la célula (Sandvig y Olsnes, 1981).

La toxina penetra al interior celular mediante endocitosis mediada por receptor (Draper y Simon, 1980; Sandvig y Olsnes, 1980). Tras penetrar en la membrana de la vesícula endocítica el fragmento A es liberado al citoplasma en donde va a catalizar la ADP-ribosilación de un residuo de diftamida del factor de elongación 2 (EF-2) (Collier, 1982). Tal modificación covalente va a suponer la inactivación del EF-2, con la consiguiente inhibición en la síntesis de proteínas. Recientemente, se ha propuesto que la toxina produce la degradación del ADN nuclear (Chang *et al.*, 1989; Lessnick *et al.*, 1990); sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de la presencia de una nucleasa contaminante (Johson, 1990; Wilson *et al.*, 1990).

La proteína ha sido caracterizada espectroscópicamente a pH neutro (Collins y Collier, 1985; Blewitt *et al.*, 1985; Cabiaux *et al.*, 1989). Asimismo, se ha determinado su estructura tridimensional a 2.5 Å de resolución mediante difracción de rayos-X (Choe *et al.*, 1992). Sin embargo, tras la observación de que la disminución del pH en los endosomas era el desencadenante de la inserción y translocación de la toxina en la membrana del endosoma (Draper y Simon, 1980; Sandvig y Olsnes, 1980), se realizaron numerosos estudios sobre el efecto que la acidez tiene en la estructura de la proteína y en la capacidad de interacción con vesículas modelo (London, 1992). Asimismo, otro desencadenante de la realización de estudios con vesículas modelo fue el descubrimiento de que la toxina diftérica penetra al interior celular directamente desde la membrana plasmática tras una disminución del pH del medio extracelular (Sandvig y Olsnes, 1980, 1981).

La existencia de cambios conformacionales inducidos por pH ácido ha sido puesta de manifiesto por estudios de CD y sensibilidad a proteasas (Hu y Holmes, 1984), así como por fluorescencia (Blewitt *et al.*, 1984, 1985) e infrarrojo (Collins y Collier, 1985; Blewitt *et al.*, 1985; Cabiaux *et al.*, 1989). El cambio conformacional es altamente cooperativo, con una transición centrada en torno a pH 5.0 a 23°C. Este cambio conformacional supone una exposición de regiones hidrofóbicas al disolvente, lo cual conduce a la agregación masiva de la proteína si en el medio no hay bicapas lipídicas (Collins y Collier, 1987), o bien a la interacción con micelas de detergente (Sandvig y Olsnes, 1981) o con vesículas de fosfolípidos (Hu y Holmes, 1984; Zalman y Winieski, 1984; Montecucco *et al.*, 1985). El comportamiento conformacional de la proteína se ha explicado considerando que la transición estructural ácida es esencialmente de carácter desnaturalizante (Zhao y London, 1986). A consecuencia de la interacción con vesículas modelo se produce la inserción de la proteína al interior hidrofóbico de la bicapa, tal y como se deriva de estudios de fotomarcage (Hu y Holmes, 1984; Zalman y Winieski, 1984; Montecucco *et al.*, 1985). En estos estudios se demuestra que tanto el fragmento A como el B son marcados por diferentes sondas fotoactivables localizadas en la región de las cabezas polares así como en el núcleo hidrofóbico de la bicapa. En bicapas planas, la toxina, íntegra o sólo su fragmento B, forma canales iónicos de baja conductancia, requiriéndose para ello más de una molécula de toxina por canal, así como la presencia de fosfolípidos ácidos (Donovan *et al.*, 1981, 1982; Hoch *et al.*, 1985). La toxina diftérica

también forma canales iónicos en la membrana plasmática de células vivas (Sandvig y Olsnes, 1988; Papini *et al.*, 1988). Sin embargo, no se ha encontrado correlación alguna entre la formación de este poro y la inhibición de la síntesis proteica, lo cual sería esperable si el poro fuese un prerequisite para la translocación de la cadena A al citoplasma (Papini *et al.*, 1988; Alder *et al.*, 1990).

La transición conformacional inducida por pH ácido determina asimismo la exposición al disolvente del puente disulfuro que une los fragmentos A y B, siendo accesible a la acción de la tiorreductasa, enzima que cataliza su reducción (Moskaug *et al.*, 1987). En este sentido cabe decir que mientras la transición conformacional del fragmento B es irreversible, la del fragmento A es reversible. Esto puede considerarse una evidencia experimental que apunta hacia el replegamiento del fragmento A en el citosol tras su translocación desde el endosoma y la permanencia estable en la membrana del fragmento B. Finalmente, la forma competente para la translocación de la toxina podría ser un agregado multimérico, aunque no hay datos precisos sobre este aspecto (Montecucco *et al.*, 1991).

### **Mecanismo de acción de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa***

La exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* es otro sistema bacteriano que ha sido caracterizado en detalle, tanto estructural como funcional (Pastan *et al.*, 1992). Un gran avance en tales estudios se produjo con la determinación de su estructura tridimensional (Allured *et al.*, 1986). La proteína consiste en una única cadena polipeptídica con tres dominios bien diferenciados (Ia, II y III) más un dominio menor (Ib). Tomando como guía esta estructura, se han expresado en *E. coli* todos los dominios independientemente con el fin de determinar su función (Hwang *et al.*, 1987). Mientras que el dominio Ia es responsable de la unión al receptor de membrana, el II es necesario para la translocación de la actividad catalítica, actividad que reside en el dominio III. Ciertas mutaciones puntuales en el dominio Ia determinan la pérdida total de unión a la superficie celular y de su citotoxicidad (Jinno *et al.*, 1988). El dominio II, compuesto por seis  $\alpha$ -hélices, es esencial para el proceso de translocación del dominio III. Tras la entrada de la proteína al interior celular se produce una ruptura proteolítica en un giro que posee tres residuos de arginina (en concreto la ruptura se produce alrededor del residuo Arg 279). Esta ruptura proteolítica genera un fragmento amino terminal de 37 kDa que es precisamente el dominio catalítico (el dominio III). Este fragmento se encuentra unido al resto de la proteína mediante un puente disulfuro (Cys 265-Cys 287), que ha de ser reducido para liberar el fragmento y permitir su translocación al interior celular (Ogata *et al.*, 1990). Ciertas mutaciones puntuales en el sitio de ataque proteolítico eliminan la citotoxicidad de la proteína (Jinno *et al.*, 1989). Del mismo modo, mutaciones en los residuos Cys 265 y Cys 287 determinan una pérdida en la citotoxicidad de la proteína (Edwards *et al.*, 1989; Madshus y Collier, 1989).

El dominio III tiene dos funciones. Por una parte, en él reside la actividad ADP-ribosilante (Siegall *et al.*, 1991; Chaudhary *et al.*, 1990) y, por otra, posee una secuencia C-terminal que dirige a la toxina endocitada hacia el retículo endoplásmico (Ogata *et al.*, 1990). Esta secuencia C-terminal, REDL, se asemeja a la secuencia KDEL que está implicada en proporcionar la capacidad de permanencia de las proteínas que la poseen en el retículo endoplásmico (Munro y Pelham, 1987). Es de destacar el hecho que otras dos toxinas, la cadena A de la toxina del cólera y la toxina termolábil de *E. coli* (Spicer y



Noble, 1982; Mekalanos *et al.*, 1983), poseen esta misma secuencia. Considerando estos resultados se ha propuesto un modelo de acción de esta toxina (Pastan *et al.*, 1992). Tras la unión a la superficie celular, la toxina penetra al interior celular mediante un proceso de endocitosis mediada por receptor. En las vesículas endocíticas la proteína sufre un cambio conformacional inducido por pH ácido y un procesamiento proteolítico (Jiang y London, 1990; Idziorek *et al.*, 1990). El fragmento de 37 kDa queda libre en el lumen del endosoma tras la reducción del puente disulfuro (Cys 265-Cys 287), produciéndose su transporte al *trans* Golgi mediante el tráfico vesicular y, de allí hasta el retículo endoplásmico. Una vez allí y mediante la maquinaria de translocación de la célula alcanza el citosol en donde cataliza la ADP-ribosilación del factor EF-2. Este modelo, aunque es muy especulativo, resulta coherente con los resultados producidos por todos los estudios bioquímicos y genéticos realizados.

### **Ricina: modelo de proteína inactivante de ribosomas**

Las proteínas inactivantes de ribosomas (RIP) son una familia de proteínas tóxicas que inactivan específica e irreversiblemente los ribosomas (Lord *et al.*, 1994). Un grupo de RIP, las RIP de tipo I, son proteínas monoméricas de alrededor 30 kDa de peso molecular y, frecuentemente, glicosiladas (Lord *et al.*, 1991). Otro tipo de proteínas inactivantes, las RIP de tipo II, están compuestas por dos cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro. Mientras una de estas cadenas posee la capacidad de unión a un receptor de membrana, generalmente un galactósido, la otra posee la actividad catalítica.

La ricina es, entre las RIP de tipo II, la proteína mejor caracterizada, estructural y funcionalmente. La proteína nativa ha sido cristalizada, determinándose su estructura tridimensional a 2.5 Å de resolución (Montfort *et al.*, 1987; Katzin *et al.*, 1991; Rutenber *et al.*, 1991; Rutenber y Robertus, 1991), y a 2.3 Å la de la cadena A recombinante (Mlsna *et al.*, 1993). Asimismo, para determinar el sitio catalítico de la cadena A se ha cristalizado un complejo entre ésta y un análogo de sustrato (Monzingo y Robertus, 1992). De este modo, se ha visto que el anillo de purina queda entre dos residuos de tirosina (Tyr-80 y Tyr-123), mientras que el residuo de triptófano 211, aunque no parece hacer contactos directos con la adenina, es importante para el mantenimiento de la conformación del centro activo. La estructura de la cadena B se puede definir como formada por dos dominios homólogos que, probablemente, se han originado por duplicación génica (Rutenber y Robertus, 1991). Cada dominio a su vez, está formado por cuatro subdominios. La estructura global de la esta cadena poseería 6 sitios de unión a galactosa, de los cuales sólo son activos 2.

El gen estructural de la ricina ha sido clonado y secuenciado (Lamb *et al.*, 1985), y formas recombinantes, tanto de la subunidad A (O'Hare *et al.*, 1990; Frankel *et al.*, 1989) como de la subunidad B (Richardson *et al.*, 1988a, 1988b; Vitteta y Yen, 1990) han sido expresadas en bacterias, levaduras, células de mamífero y oocitos de *Xenopus*. La estrategia más comúnmente empleada para la expresión de la toxina en sistemas heterólogos es la de producir las dos cadenas independientemente para posteriormente obtener la toxina biológicamente activa tras la asociación de las cadenas (Lord *et al.*, 1994). En la situación *in vivo* el gen estructural codifica para un precursor denominado pre-pro-ricina que, tras la eliminación de un segmento N-terminal, originará la pro-ricina (Richardson *et al.*, 1989) que, a su vez, tras la eliminación del péptido conectivo entre los dos fragmentos definitivos, originará la forma biológicamente activa (Harley y Lord,

1985). La cadena A posee actividad N-glicosidasa, responsable de la inactivación de los ribosomas mediante la eliminación de la adenina 4324 de la molécula rRNA 28S (Endo *et al.*, 1987). La cadena B posee dos dominios de unión a galactosa, cada uno de los cuales tiene a su vez tres sitios de unión a tal azúcar de los que sólo uno es activo en cada dominio (Rutenber y Robertus, 1991).

La ricina penetra al interior celular mediante procesos dependientes e independientes de clatrina (Lord *et al.*, 1994). Los componentes de membrana con residuos de galactosa, ya sean glicoproteínas o glicolípidos, actúan como receptores para la toxina (Lord *et al.*, 1994). Gran número de evidencias apuntan hacia la implicación de la red *trans* del aparato de Golgi en la entrada de la toxina (Sandvig *et al.*, 1992; van Deurs *et al.*, 1993; Pelham *et al.*, 1992); de hecho, la inhibición del transporte de vesículas a esta red supone la protección de la célula frente a la toxina (van Deurs *et al.*, 1993). Asimismo, el tratamiento con Brefeldina A, droga que desorganiza el aparato de Golgi, protege frente a la intoxicación, no sólo por ricina sino también por otras toxinas, incluyendo la toxina Shiga (Sandvig *et al.*, 1991; Yoshida *et al.*, 1991). Finalmente, se ha demostrado que existe transporte retrógrado desde el Golgi hasta el retículo endoplásmico (Sandvig *et al.*, 1992), aunque no se ha determinado que tal transporte esté implicado en la intoxicación por ricina (Sandvig y van Deurs, 1994). En algún momento durante el transporte vesicular, la cadena B facilita, directa o indirectamente, la entrada de la cadena A al citosol, siendo la región de unión a galactosa la implicada en ello (Kozlov *et al.*, 1988). Tras la entrada de la cadena A al citosol, ésta ejerce su acción N-glicosidasa sobre la molécula rRNA 28S, produciendo la liberación de la adenina 4234, inactivando irreversiblemente al ribosoma (Endo *et al.*, 1987).

Finalmente cabe decir que el mecanismo de entrada de la toxina Shiga, causa de la disentería, comparte numerosas características con el descrito para la ricina (Sandvig y van Deurs, 1994). En este caso sí se ha demostrado sin embargo que el transporte retrógrado puede ser necesario para la intoxicación por esta toxina (Sandvig *et al.*, 1992).

Las RIP de tipo I como ya se ha dicho, están compuestas por una única cadena polipeptídica que carece de un dominio de unión a un receptor. Este hecho va a suponer que estas proteínas sean menos tóxicas comparadas con las RIP de tipo II (Stirpe *et al.*, 1992). Aun así, algunas son especialmente tóxicas para algunos tipos de células, como por ejemplo, macrófagos (Barbieri y Stirpe, 1982) y trofoblastos (Chang *et al.*, 1979; Wang *et al.*, 1986; Yeung *et al.*, 1988), posiblemente debido a su alta actividad pinocítica. La elevada actividad citotóxica sobre los trofoblastos es la causa de la capacidad abortiva de numerosas RIP de tipo I como, por ejemplo, la tricosantina (Yeung *et al.*, 1988), la saporina (Stirpe *et al.*, 1983), la momordina (Barbieri *et al.*, 1980) y, en menor extensión, la gelonina (Stirpe *et al.*, 1980). La  $\alpha$ -sarcina se ha demostrado citotóxica para numerosas líneas tumorales humanas (Turnay *et al.*, 1993). Asimismo, numerosas RIP de tipo I de plantas resultan ser agentes antivirales, tanto en tejidos vegetales como en tejidos animales (Aron e Irvin, 1980; Foá-Tomasi *et al.*, 1982). La actividad antiviral de estas proteínas se ha relacionado con un aumento en la permeabilidad al citoplasma de las células infectadas por virus. Esta mayor accesibilidad es debida a los cambios que sufre la célula en las propiedades de permeabilidad de la membrana plasmática (Ready *et al.*, 1986).

La gran eficacia catalítica de las RIP de tipo I las hace excelentes elementos para la preparación de inmunotoxinas. En este sentido, las inmunotoxinas con gelonina,

saporina, PAP, briodina o momordina son más eficaces incluso que las realizadas con la cadena A de la ricina (Lambert *et al.*, 1988).

## REQUISITOS ESTRUCTURALES PARA LA TRANSLOCACION DE PROTEINAS A TRAVES DE MEMBRANAS EN SISTEMAS CELULARES

Ciertas proteínas pueden translocarse a través de membranas celulares mediante un proceso post-traducciona (Eilers y Schatz, 1986; Schatz, 1986; Rothmann y Konberg, 1986; Zimmermann y Meyer, 1986). Este fenómeno no sólo se ha demostrado que ocurre en membranas del retículo endoplásmico (Walter *et al.*, 1984; Schatz, 1986), sino también en membranas bacterianas (Saier *et al.*, 1989), mitocondriales (Verner y Schatz, 1988) y de cloroplastos y glioxisomas (Ellis y Robinson, 1987). Del mismo modo, toxinas proteicas completamente plegadas y estables en solventes acuosos son capaces de translocarse a través de la membrana de los organismos diana (Montecucco *et al.*, 1991; Parker y Pattus, 1993).

Cómo una proteína completamente plegada, soluble en un entorno acuoso, es capaz de insertarse y, en algunos casos, translocarse a través de membranas, supone hoy día uno de los principales retos en la química de proteínas (Rothmann y Konberg, 1986; Montecucco *et al.*, 1991; Parker y Pattus, 1993).

Estudios sobre translocación de proteínas llevados a cabo en sistemas libres de células, han determinado que uno de los requisitos necesarios para que un polipéptido se transloque a través de membranas es que éste debe sufrir un proceso de desplegamiento, debe perder la estructura terciaria estable (Randall y Hardy, 1986; Eilers *et al.*, 1988). Este hecho ha llevado a definir lo que se conoce como estructura competente para la translocación de un polipéptido (Chen y Douglas, 1987; Meyer, 1988; Kumamoto, 1991). Así, la estabilización de una estructura terciaria estable en una proteína impide que ésta pueda translocarse. Eilers y Schatz (1986) demostraron que la enzima citosólica dihidrofolato reductasa (DHFR) con un péptido señal mitocondrial en su extremo amino terminal no era importada al interior de la mitocondria cuando ésta era estabilizada frente a la digestión trípica por unión de metotrexato (o cualquier otro derivado de folato) o mediante la introducción de puentes disulfuro internos (Vestweber y Schatz, 1988; Vestweber *et al.*, 1989). En ausencia de tal tipo de ligandos estabilizantes la proteína era eficazmente translocada al interior mitocondrial. Asimismo, la translocación del citocromo c queda bloqueada por la estabilización que provoca la unión del grupo hemo (Hay *et al.*, 1984). La necesidad de una conformación parcialmente desplegada para que tenga lugar el proceso de translocación en sistemas celulares puede deducirse igualmente de estudios con proteínas híbridas entre una proteína competente para translocarse y una proteína, o un fragmento de la misma, que adopta un plegamiento estable. Así, la fusión de un fragmento de la enzima citosólica  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, que adopta una estructura terciaria estable, bloquea totalmente la translocación del precursor de la fosfatasa alcalina, también de *E. coli*, proteína que *per se* es competente para la translocación (Lee *et al.*, 1989). Las mismas conclusiones se derivan del estudio de la translocación de la proteína de unión de fosfato PhoE de *E. coli* (Pagès *et al.*, 1984; Anba *et al.*, 1986); de la translocación de la proteína de unión de maltosa de *E. coli* (Randall y Hardy, 1986), etc. En esta misma línea, se han conseguido atrapar ciertas proteínas en etapas intermedias del proceso de translocación, es decir, con las cadenas polipeptídicas transitoriamente unidas a membranas. En todos los casos estudiados la cadena polipeptídica se encontraba en un

estado no nativo, desplegado, muy sensible a proteólisis (Schleyer y Neupert, 1985; Eilers y Schatz, 1986; Vestweber y Schatz, 1988; Vestweber *et al.*, 1989). Una cadena polipeptídica ha de perder por lo tanto su estructura terciaria estable, es decir, sufrir una desnaturalización parcial, para que pueda ser translocada a través de la membrana celular.

De los resultados anteriores se deriva la necesidad lógica de ciertos factores en el interior celular que mantengan el estado de competencia para la translocación de las proteínas que van a ser exportadas (Meyer, 1988). Tales factores proteicos que modulan el estado conformacional de las cadenas polipeptídicas se han denominado chaperones, término inicialmente propuesto por Laskey y Earnshaw (1980). Actualmente, se define chaperón molecular a una proteína que se une y estabiliza a un conformero inestable de otra proteína y que mediante una unión y disociación controlada facilita el destino correcto de la proteína sustrato, ya sea éste el plegamiento correcto, la formación de estructuras oligoméricas, el transporte a compartimentos subcelulares, o el control de su actividad (Hendrick y Hartl, 1993). Para llevar a cabo tales funciones los chaperones han de reconocer elementos estructurales de las proteínas presentes únicamente en el estado no nativo.

### **Relaciones estructura-función en la translocación de proteínas tóxicas a través de membranas**

Numerosas proteínas que son segregadas al medio extracelular han de insertarse y atravesar una bicapa lipídica para ejercer su acción biológica. Ciertas toxinas proteicas poseen dianas citoplasmáticas, por lo que necesariamente han de alcanzar el citosol para llevar a cabo su acción tóxica (Montecucco *et al.*, 1991; Olsnes *et al.*, 1993). Los aspectos relativos a los requerimientos estructurales necesarios para que estas proteínas interactúen con membranas y, como consecuencia de ello, se inserten y/o transloquen a su través, suponen, al igual que los procesos anteriormente descritos, parte del problema de cómo una proteína hidrosoluble atraviesa membranas (Rothmann y Konberg, 1986; Montecucco *et al.*, 1991; Parker y Pattus, 1993). Gran parte del conocimiento que se posee actualmente en este terreno se ha obtenido gracias a la resolución de las estructuras tridimensionales de estas toxinas. En este sentido, se conocen las estructuras tridimensionales de la toxina de la difteria de *Corynebacterium diphtheriae* (London, 1992; Olsnes *et al.*, 1993; Parker y Pattus, 1993), del dominio formador del poro de la colicina A de *Escherichia coli* (Parker *et al.*, 1989; Parker *et al.*, 1990; van der Goot *et al.*, 1991), de la  $\delta$ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* (Li *et al.*, 1991) y de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (Pastan *et al.*, 1992).

Se han encontrado similitudes estructurales entre estas proteínas, que han permitido postular un mecanismo similar de inserción en la membrana que podría poner de manifiesto pautas comunes para las toxinas bicatenarias o multicatenarias (Parker y Pattus, 1993). La estructura básica de estas proteínas está formada por una agrupación de  $\alpha$ -hélices (entre 7 y 10) organizadas en tres capas. Cada capa está formada por 2 ó más hélices antiparalelas, algunas de las cuales están totalmente protegidas del disolvente. En todos los casos, hay al menos dos  $\alpha$ -hélices que por su naturaleza hidrofóbica y por su longitud se puede afirmar que podrían atravesar la bicapa lipídica, si se orientan perpendicularmente al plano de la membrana. Este plegamiento común representa una forma soluble de empaquetamiento para hélices hidrofóbicas o anfipáticas que, *per se*, tienen la capacidad de insertarse en membranas (Eppand, 1993). Esta similitud en estas

proteínas consideradas no se manifiesta a nivel de estructura primaria por lo que se sugiere podría ser producto de una evolución convergente.

La conversión de una forma hidrosoluble a otra forma de membrana conlleva reestructuraciones en las toxinas anteriores. La existencia de cambios conformacionales en la toxina diftérica a consecuencia de una disminución de pH (condición que ha de darse para que la cadena A de la misma se transloque) se ha determinado por aumento de sensibilidad a proteasas y estudios de dicroísmo circular (Hu y Holmes, 1984), así como por técnicas de fluorescencia (Blewitt *et al.*, 1984). En este estudio se demuestra que el cambio conformacional viene acompañado de un aumento de hidrofobicidad que, en ausencia de membranas puede conducir a una agregación masiva de la proteína (Collins y Collier, 1987). El comportamiento de la proteína desnaturalizada térmicamente a pH 7.0, en cuanto a la capacidad de interaccionar con membranas resulta ser comparable al que demuestra la proteína cuando se encuentra a pH ácido; esto es, el cambio conformacional disparado por disminución de pH se puede asemejar a un cambio desnaturalizante (Zhao y London, 1986). Sin embargo, las estructuras de estas formas de la proteína son diferentes entre sí y, a su vez, claramente distintas de la estructura de la proteína desnaturalizada por cloruro de guanidinio. Este comportamiento conformacional se ha explicado considerando que algún dominio de la toxina tiene propiedades características de estado de "molten globule", estado que se reconoce hoy día como importante en fenómenos de plegamiento desplegamiento de proteínas, incluyendo procesos de translocación a través de membranas (Pheil *et al.*, 1986; Ptitsyn, 1987; Bychkova *et al.*, 1988; Baum *et al.*, 1989; Goto y Fink, 1989; Martin *et al.*, 1991). Este estado se caracteriza por poseer una compactación y contenido en estructura secundaria similar a los mostrados por el estado nativo, pero sin una estructura terciaria definida según se deriva de estudios de dicroísmo circular (Ptitsyn, 1987). Conclusiones similares a las descritas para la toxina de la difteria se han determinado para las colicinas (Lakey *et al.*, 1994), en donde de nuevo se alude a características propias del glóbulo fundido para explicar el comportamiento conformacional de la colicina A (van der Goot *et al.*, 1991), así como para la exotoxina A (Farahbakhsh *et al.*, 1987; Farahbakhsh y Wisnieski, 1989). En el caso del fragmento formador del poro de la colicina A, se ha demostrado que su capacidad de inserción en la bicapa es pH dependiente, de modo que es mayor a pH ácido. La variación de la constante cinética de inserción se correlaciona con la aparición de un estado con propiedades típicas del glóbulo fundido (van der Goot *et al.*, 1991).

Las relaciones estructura-función en las toxinas monocatenarias en cuanto a la interacción con membranas están peor caracterizadas que en los casos anteriores. De cualquier modo, en alguna etapa del proceso de internación al citosol ha de darse una interacción proteína-membrana gracias a la cual se va a producir el paso de esta proteína al interior celular. En este sentido, se ha demostrado que proteínas hidrosolubles monocatenarias sometidas a pH ácido sufren cambios conformacionales que determinan una exposición de regiones hidrofóbicas merced a las cuales pueden desestabilizar membranas modelo e inducir su fusión. Este hecho sería similar al que aparece en las toxinas bicatenarias. Así, este fenómeno se ha demostrado con el citocromo c (Gad *et al.*, 1982), clatrina (Hong *et al.*, 1985), insulina (Farias *et al.*, 1985), lisozima (Arvinte *et al.*, 1986),  $\alpha$ -lactalbúmina (Kim y Kim, 1986). Este proceso de interacción con vesículas modelo podría indicar que, al igual que con las toxinas bicatenarias o multicatenarias, variaciones en los parámetros fisicoquímicos del entorno pueden inducir cambios estructurales en éstas que las capacite para interaccionar con membranas. Harter *et al.*

(1988) sugieren que los marcajes con sondas fotoactivables utilizados en sus experimentos reflejan una propiedad general de una proteína que se caracteriza por "un estado compacto con estructura terciaria fluctuante" (Dolgikh *et al.*, 1981, 1984). Recientemente, se ha estudiado la interacción de la ricina, así como sus cadenas A y B independientemente, con vesículas modelo de PC y DOPC (Ramalingam *et al.*, 1994). En este trabajo se demuestra que la cadena A interacciona con membranas de una forma dependiente del pH, de modo que su inserción de ambas es mayor a pH ácido. Interesantemente, su hidrofobicidad es mayor en condiciones ácidas debido un cambio conformacional que determina la exposición de la región altamente hidrofóbica, en concreto, la región comprendida entre los residuos 247-257 (Ramalingam *et al.*, 1993; Houston, 1982).

En cualquier caso, los requerimientos estructurales de las proteínas monocatenarias para que interaccionen con membranas no se han caracterizado aún en detalle. Quizás, tales requerimientos estructurales que permiten la interacción con membranas estén directamente relacionados con la capacidad de estas proteínas para desestabilizar membranas y translocarse a su través.

## FUSION DE MEMBRANAS

Las membranas biológicas se caracterizan por su estabilidad y por su carácter dinámico (Gennis, 1989). La estabilidad es un requisito necesario para un elemento biológico que estrictamente define o delimita diferentes compartimentos funcionales y estructurales. Por otra parte, el dinamismo poseería el mismo rango de necesidad, considerando que en todos los compartimentos biológicos definidos por membranas existen procesos de transporte de materia, o de información, en sentido amplio, entre el exterior y el interior, o bien, son elementos que participan en procesos que implican fusión y/o fisión de membranas (Blumenthal, 1987; Wilschut, 1991). La integración de estas dos propiedades hacen del proceso de fusión un fenómeno de carácter local, desde un punto de vista espacial, en el que se producen estados intermedios, a menudo reversibles, resultado de la acción de proteínas específicas. La energía requerida para el fenómeno de fusión, característica de los propios componentes de la membrana, se emplea para modificar la organización de los lípidos de membrana de forma tal que se establezca la continuidad acuosa y lipídica una vez finalizado el proceso de fusión (Zimmerberg *et al.*, 1993).

Gran parte del conocimiento de los posibles mecanismos de fusión de membranas y de interacción proteína-lípido se deriva de la investigación de sistemas modelo en los que se emplean vesículas lipídicas o liposomas (Wilschut y Hoekstra, 1984, 1986; Szoka, 1987). El empleo de sondas fluorescentes asociadas a vesículas ha permitido el desarrollo de ensayos cinéticos, requisito esencial para la determinación de mecanismos moleculares de interacción proteína-lípido (Düzgünes y Wilschut, 1993; Hoekstra y Düzgünes, 1993).

La fusión de membranas implica necesariamente el abandono transitorio de la estructura definida por la bicapa lipídica (Hui *et al.*, 1981; MacDonald, 1990). Independientemente de la naturaleza del intermedio de fusión, debe existir una fuente de energía para que se origine tal transición; el estudio de las fuerzas que se establecen entre dos bicapas está por ello directamente relacionado con el proceso de fusión (Helm y Israelachvili, 1993). La mayor parte del conocimiento a este respecto se ha obtenido a partir de estudios de agregación de liposomas (Nir *et al.*, 1983; Düzgünes *et al.*, 1985;

Bentz y Ellens, 1988), de la medida directa de las fuerzas entre bicapas adsorbidas en superficies de mica (Horn, 1984; Marra *et al.*, 1985) y de las fuerzas existentes entre vesículas multilamelares (McIntosh y Simon, 1986; Rand, 1981)

El proceso global de fusión se puede dividir en dos etapas diferentes: agregación y desestabilización de las bicapas (Walter y Siegel, 1993). Las fuerzas implicadas en este proceso comprenden: (1) fuerzas electrostáticas o de Coulomb, (2) fuerzas atractivas de Van der Waals y (3) fuerzas repulsivas de hidratación (Nir y Bentz, 1978; Rand, 1981; McIntosh, 1986; Helm y Israelachvili, 1993). Una condición suficiente para la formación de un agregado estable de vesículas es la existencia de al menos un mínimo local de energía libre de interacción entre las vesículas (mínimo secundario), que es función esencialmente de las interacciones electrostáticas y las fuerzas de Van der Waals (Wilschut, 1991). Por otra parte, para que se produzca el contacto molecular entre bicapas han de vencerse las fuerzas repulsivas de hidratación, que comienzan a ser significativas a distancias comprendidas entre 2 y 3.5 nm, dependiendo de la naturaleza del lípido implicado. Se ha postulado otra fuerza de atracción en sistemas de PE en la que la formación de enlaces por puentes de hidrógeno por moléculas de agua entre las bicapas que interaccionan sería el factor clave (Rand *et al.*, 1988).

En general, las proteínas o péptidos pueden inducir agregación y/o fusión de liposomas mediante varios mecanismos (Hong *et al.*, 1991). Independientemente del mecanismo, proteínas o péptidos han de interferir en las fuerzas existentes entre las vesículas, ya sea disminuyendo la repulsión electrostática o disminuyendo la repulsión por hidratación (Hoekstra y Kok, 1989; Hong *et al.*, 1991). En cualquier caso, la agregación de vesículas estará influida por interacciones lípido-proteína, en donde una sola molécula de proteína sirve de puente entre las dos vesículas a agregar; o bien, lo estará por interacciones proteína-proteína, en donde un agregado de moléculas de proteína actúa como puente (Lampe *et al.*, 1983; Hong *et al.*, 1991). Otra posibilidad que también se ha considerado, es que proteínas o péptidos afecten las propiedades de la superficie de las vesículas de modo tal que establezcan interacciones lípido-lípido como directoras de la agregación (Hong *et al.*, 1991). Un sistema modelo caracterizado en detalle es el de la fusión de vesículas inducido por poli-lisina (Stollery y Vail, 1978; Gad *et al.*, 1982). La poli-lisina induce fusión de liposomas compuestos por PS; la condición óptima de este proceso se produce cuando se maximiza el número de sitios vesícula-péptido-vesícula y cuando la carga neta del agregado es cero. Por lo tanto, la neutralización de cargas parece esencial para el fenómeno de fusión.

De un modo similar, péptidos naturales tales como la melitina y la polimixina B inducen fusión de vesículas ácidas (Eytan y Almary, 1983; Hong y Vacquier, 1986). En estos casos el carácter anfipático de los péptidos les capacita para incorporarse a las bicapas, mientras que sus extremos policationicos actuarían de "puente" entre las vesículas; de nuevo, la fusión es óptima en condiciones en las que la neutralización de cargas es máxima (Hong y Vacquier, 1986). La neutralización de cargas es también necesaria en el proceso de agregación inducida por la proteína básica de la mielina (Lampe y Nelsestuen, 1982). La disminución de la carga positiva neta de la proteína por fosforilación o eliminación de residuos de arginina disminuye su capacidad de agregación (Cheifetz y Moscarello, 1985). En este caso, la agregación sólo ocurre cuando los liposomas se encuentran saturados de moléculas de proteína, lo cual es indicativo de la existencia de un "puente" proteína-proteína entre las vesículas (Lampe *et al.*, 1983).

La agregación de vesículas inducida por proteínas y péptidos no conduce necesariamente a fusión a no ser que se produzca una desestabilización de la bicapa (Batenburg *et al.*, 1985; White, 1992; Yoshimura *et al.*, 1992; Zimmerberg *et al.*, 1993). La penetración en el interior hidrofóbico afectaría directamente a la movilidad de los lípidos, posibilitando la adopción de estructuras no lamelares que pueden conducir a fusión (Hong *et al.*, 1991; Zimmerberg *et al.*, 1993). Numerosos resultados en este sentido se derivan de los estudios de fusión de membranas inducido por los denominados péptidos de fusión de proteínas virales (Lear y DeGrado, 1987; Rafalsky *et al.*, 1991; Düzgünes y Shavnin, 1992; White, 1992; Stegmann y Helenius, 1993; Wilschut y Bron, 1993; Rapaport y Shai, 1994). En algunos de estos sistemas modelo se demuestra que la desestabilización de membrana aun siendo un requisito necesario para inducir fusión puede no ser un requisito suficiente (Rapaport *et al.*, 1993). Así, péptidos incorporados en el interior hidrofóbico de las bicapas caracterizados por niveles reducidos en su contenido de  $\alpha$ -hélice, aun perturbando las bicapas no inducían fusión. Aparentemente, la capacidad de un péptido para adoptar una estructura en  $\alpha$ -hélice es también un requisito para que éste sea competente a la hora de inducir fusión. Este resultado ha sido obtenido con péptidos derivados de la hemaglutinina del virus de la gripe (proteína responsable inequívocamente de la fusión con membranas plasmáticas) (Lear y DeGrado, 1987; Wharton *et al.*, 1988; Rafalsky *et al.*, 1991), así como con péptidos anfipáticos modelo (Parente *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1992). La eliminación de la estructura helicoidal de estos péptidos mediante introducción de residuos de prolina (Lee *et al.*, 1992) o por la sustitución de dos L-aminoácidos por sus enantiómeros D-aminoácidos (Rapaport *et al.*, 1993) determina la pérdida de la capacidad fusogénica del péptido. En términos más generales se puede decir que la capacidad fusogénica de péptidos depende de la integración de factores estructurales, tales como estructura secundaria en  $\alpha$ -hélice, grado de penetración en la bicapa, capacidad de autoagregación, y propiedades funcionales tales como capacidad de agregación de vesículas y de desestabilización de membranas (Rapaport y Shai, 1994).



## **OBJETIVOS**

El hecho de que la  $\alpha$ -sarcina sea una proteína citotóxica implica que este polipéptido posee, al menos, dos funciones: una muy específica actividad ribonucleolítica, y la capacidad para acceder al interior de las células sobre las que actúa. Para desentrañar el mecanismo molecular de esta última cabría pensar en la existencia de receptores proteicos para la toxina. Pero no hay ningún indicio de que los haya. Es más, el hecho de que la  $\alpha$ -sarcina sea capaz de interaccionar con vesículas lipídicas de fosfatidilglicerol puede sugerir que el acceso de la proteína al interior celular esté mediado por interacciones con fosfolípidos de la membrana. Con estas perspectivas, los objetivos planteados en esta fase han sido los siguientes:

- \* Análisis de la posible interacción de la  $\alpha$ -sarcina con fosfatidilserina, como fosfolípido ácido de mayor abundancia en las membranas biológicas que los ya analizados fosfatidilgliceroles.
- \* Estudio de la accesibilidad de la proteína al medio intravesicular, al objeto de valorar si sus efectos sobre bicapas pueden resultar en una translocación operativa en sistemas modelo.
- \* Modelización de la interacción con vesículas modelo.
- \* Análisis de las relaciones estructura-función en lo que se refiere a la capacidad de la  $\alpha$ -sarcina para interaccionar con membranas.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

## Materiales

El cultivo inicial de *Aspergillus giganteus* MDH 18894, a partir del cual se purifica la  $\alpha$ -sarcina fue cedido por el Dr. Yaeta Endo de Yamanashi Medical College (Japón). Los fosfolípidos sintéticos dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), dimiristoilfosfatidilserina (DMPS), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), los fosfolípidos marcados fluorescentemente N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)-dimiristoilfosfatidiletanolamina (NBD-PE) y N-(7-lisamina rodamina B sulfonil)-diacilfosfatidiletanolamina (Rh-PE), así como el fosfolípido natural fosfatidilserina de cerebro bovino (PS<sub>c</sub>), fueron suministrados por Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA). Los fosfolípidos fosfatidilglicerol de huevo (PG<sub>h</sub>) y fosfatidilcolina de huevo (PC<sub>h</sub>) fueron de Sigma (St. Louis, MO, USA). La asolectina aislada de semilla de soja y posteriormente purificada fue cedida por el Dr. C. Montecucco de la Universidad de Padua (Italia).

La sonda fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), fue proporcionada por Aldrich (Milwaukee, WIS, USA), mientras que su derivado trimetilamonio-DPH (TMA-DPH), así como el ácido 1-aminonaftaleno-3,6,8-trisulfónico (ANTS) y su apagador bromuro de N,N'-p-xililen-bis-piridinio (DPX), así como antraceno (ANT) lo fueron por Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

Los lípidos fotoactivables 1-palmitoil-2-(2-azido-4-nitrobenzoil)-sn-glicero-3-[<sup>3</sup>H]fosfocolina(PCI) y 1-miristoil-2-[12-(4-azido-2-nitrofenil)amino]dodecanoil-sn-glicero-3-[<sup>14</sup>C]-fosfocolina (PCII) fueron sintetizados en el laboratorio del Dr. C. Montecucco.

La tripsina tratada con TPCK fue de Merck (Darmstadt, Alemania), la clostripaína fue de Millipore Co. (Freehold, NJ, USA) y el inhibidor de tripsina de clara de huevo fue de Boehringer (Mannheim, Alemania).

## Purificación de la $\alpha$ -sarcina

Los procedimientos de purificación están basados en los inicialmente descritos (Olson y Goerner, 1965; Olson *et al.*, 1965). El hongo *Aspergillus giganteus* se crece en un medio líquido (2% almidón de maíz, extracto de ternera 1.5%, peptona 2% y cloruro sódico 0.5%) a 30°C durante 70-90 horas. La producción de  $\alpha$ -sarcina se registra midiendo la absorbancia a 280 nm y el pH del medio de cultivo, así como mediante PAGE-SDS. Alcanzado el momento de máxima producción, el medio extracelular es separado del micelio y dializado exhaustivamente frente a tampón fosfato 50 mM, pH 7.0. La  $\alpha$ -sarcina se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico con una resina Amberlita IRC-50, seguida de sucesivas cromatografías de penetrabilidad, en concreto, un Biogel P10 y un Biogel P2. La proteína purificada se obtiene con un rendimiento que oscila entre 5-50 mg/l de cultivo.

## Espectros de absorción en la región UV-visible

Las medidas espectroscópicas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU-7 a una velocidad de barrido de 300 nm/min. Para ello se emplearon cubetas de cuarzo de pasos ópticos de 0.1 y 1.0 cm, dependiendo del volumen y concentración de la muestra. La concentración de  $\alpha$ -sarcina se determinó considerando un coeficiente de extinción  $E^{0.1\%}(280 \text{ nm}, 1 \text{ cm}) = 1.34$  (Gavilanes *et al.*, 1983).

### **Espectros de dicroísmo circular**

Los espectros de dicroísmo circular (CD) fueron realizados en un dicrógrafo Jobin Yvon Mark III equipado con un arco de xenon de 250 W. Las disoluciones de proteína se analizaron en cubetas de 0.01 y 0.05 cm de paso óptico en la región del UV-lejano (longitudes de onda inferiores a 250 nm) y de 1 cm en el UV-próximo (320-250 nm), respectivamente. Los resultados se expresan como valores de elipticidad molar por residuo de aminoácido ( $\theta_{mrw}$ ) en unidades de grado  $\times$  cm<sup>2</sup>  $\times$  dmol<sup>-1</sup>, tomando para la  $\alpha$ -sarcina 113 como peso molecular promedio por residuo (Sacco *et al.*, 1983). La concentración de proteína empleada para las medidas en las regiones del UV-lejano y del UV-próximo se mantuvo comprendida en los intervalos respectivos 0.1-0.5 mg/ml y 0.5-1 mg/ml. Por otra parte, la concentración de péptido empleada estuvo comprendida entre 0.5 y 1 mg/ml. En este último caso, las medidas en presencia de vesículas lipídicas o micelas de detergente, se realizaron siempre en una cubeta de 0.01 cm de paso óptico. La concentración de proteína fue determinada por medidas de absorción, o bien mediante análisis de aminoácidos, y las concentraciones de péptidos mediante análisis de aminoácidos.

### **Espectros de fluorescencia**

Los espectros de fluorescencia fueron realizados en un espectrofluorímetro SLM Aminco 8000C equipado con un arco de xenon de 450 W, empleando cubetas de 0.2 ó 0.4 cm de paso óptico. Las medidas fueron realizadas a 25°C ó 37°C. Las anchuras de rendija fueron de 4 nm, tanto para el haz de excitación como para el haz de emisión. El voltaje de los canales de ajustó en cada caso de modo que la señal recibida se encontró siempre entre los límites aconsejados. Cuando fue necesario, para evitar los efectos de la dispersión de luz debida a la turbidez de las mezclas proteína-vesículas, se emplearon polarizadores de calcita Glan-Thompson (el polarizador de excitación se orientó horizontalmente (90°) y el de emisión verticalmente (0°); en cualquier caso, la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de excitación nunca fue superior a 0.06. Todos los espectros de emisión de fluorescencia de proteínas obtenidos fueron corregidos por el factor instrumental del aparato.

### **Medidas de polarización de fluorescencia**

Las medidas de polarización de fluorescencia se han llevado a cabo en un espectrofluorímetro SLM Aminco 8000C en cubetas de 0.2 cm de paso óptico. Los polarizadores empleados, tanto para la excitación como para la emisión, fueron polarizadores de calcita Glan-Thompson. Las vesículas empleadas fueron marcadas con 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), o bien con su análogo trimetilamonio-DPH (TMA-DPH) de acuerdo a Gavilanes *et al.* (1985). La relación DPH/lípido o TMA-DPH/lípido fue 1/1000 ó 1/100, respectivamente. El tampón empleado fue Mops 50mM, NaCl 0.1M, EDTA 1mM, pH 7.0, siendo la concentración de lípido de 80  $\mu$ g/mL. Tras la excitación a 365 nm, se midieron simultáneamente las componentes horizontal y vertical de la radiación emitida a 425 nm por DPH o TMA-DPH; los resultados son proporcionados en forma de valores de polarización o de anisotropía de fluorescencia.

### **Espectros de absorción en el infrarrojo**

Las medidas de absorción en el infrarrojo fueron realizadas en un espectrofotóme-

tro Nicolet 520 FT-IR. La muestra de proteína o de complejo lípido-proteína fue dispuesta entre dos ventanas de  $\text{CaF}_2$ , empleando separadores de teflón de 50  $\mu\text{m}$ . Todos los tampones empleados para la disolución de las muestras fueron preparados en presencia de  $\text{D}_2\text{O}$ . Previamente a la toma de datos se procede a la termostatación de la cámara de observación mediante la acción de un baño circulante, así como a la eliminación del vapor de agua de la misma cámara gracias a un compresor de aire seco (Balston). Para cada ensayo se adquieren 216 barridos tanto de referencia (aire) como de muestra. Los barridos de promedio y se apodizan con la función Happ-Gentzel, obteniéndose una resolución de  $2\text{ cm}^{-1}$ . Los interferogramas de la muestra y de los disolventes se transforman en espectros de transmitancia, se relativizan con el espectro de referencia y se transforman posteriormente en espectros de absorbancia. La contribución de los disolventes se elimina del espectro original de la muestra mediante sustracción digital.

### **Formación de vesículas de fosfolípidos**

El protocolo de formación de vesículas lipídicas empleado supone la hidratación de una película lipídica obtenida por evaporación a vacío de una disolución orgánica del fosfolípido (cloroformo/metanol 2:1). La hidratación se realiza durante 1 h a una temperatura superior a la temperatura de transición de fase del fosfolípido ( $T_m$ ); en el caso de emplear una mezcla de fosfolípidos, la temperatura de hidratación fue siempre superior a la del fosfolípido que posee mayor  $T_m$ . El tampón empleado dependió del ensayo que se pretende realizar. La suspensión de lípidos formada tras la etapa de hidratación, constituida por vesículas multilamelares, se somete a cinco ciclos sucesivos de extrusión en un Extruder (Lipex Biomembranes) a través de dos filtros de policarbonato de 100 nm de diámetro de poro. Con esta metodología se consigue una población de vesículas unilamelares con un diámetro promedio centrado alrededor del diámetro del poro del filtro (Mayer *et al.*, 1985, 1986; Hope *et al.*, 1985).

### **Ensayos de unión proteína-vesícula**

Los estudios de unión de  $\alpha$ -sarcina a vesículas lipídicas se llevaron a cabo mediante dos metodologías: ultrafiltración y ultracentrifugación. En ambos casos las muestras correspondientes a diferentes relaciones lípido-proteína se incubaron a  $37^\circ$  ( $42^\circ\text{C}$  para DMPS) durante 1 h en Mops 50mM, NaCl 0.1 M, EDTA 1mM, pH 7.0; la concentración de lípido empleada fue de 160  $\mu\text{M}$ . En la separación del complejo lípido-proteína realizada mediante ultrafiltración se emplearon filtros Millipore SJGVLO4NS de 0.22 micras de diámetro de poro; tras la filtración se determinó el contenido en proteína y fósforo del filtrado. El contenido de fósforo en éste era nulo, así como también lo era la retención de proteína libre en el filtro, según ensayos control sin vesículas. En el caso de la ultracentrifugación, el complejo lípido-proteína se centrifugó en una AIR-FUGA (Beckman Airfuge) empleando un rotor tipo A-95. La centrifugación se realizó a  $160000 \times g$  (90000 rpm) durante 45 min a  $4^\circ\text{C}$ . Tras la ultracentrifugación se determinó el contenido en fósforo y en proteína del sobrenadante. En las condiciones del ensayo la sedimentación de proteína libre en ausencia de vesículas es nula, así como la presencia de vesículas en el sobrenadante (esto último se determinó usando fosfolípidos marcados radiactivamente).

### **Ensayos de agregación de vesículas**

Los estudios de agregación de vesículas de fosfolípidos se llevaron a cabo midiendo

la variación de absorción a 360 nm de una suspensión de vesículas de fosfolípidos recién preparadas tras añadir  $\alpha$ -sarcina. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU-8 equipado con portacubetas termostatizado. En todos estudios se consideraron controles en ausencia de proteína. Los ensayos se realizaron en Mops 50mM, NaCl 0.1 M, EDTA 1mM, pH 7.0 a 37°C (42°C para DMPS).

### Ensayos de mezcla de lípidos

La mezcla de lípidos de membranas se estudió mediante medidas de la variación de la transferencia de energía de resonancia (Struck *et al.*, 1981). Para ello se emplearon vesículas que contenían incorporadas en la bicapa las sondas fluorescentes NBD-PE y Rh-PE al 1% y 0.6%, respectivamente. De acuerdo con este esquema experimental, la mezcla de reacción contenía una población de vesículas compuesta por vesículas marcadas y vesículas no marcadas a una relación 1:9 ó 1:1. En la situación inicial las sondas fluorescentes se encuentran en la bicapa a una densidad superficial tal que hay una elevada transferencia de energía de resonancia entre ellas (el NBD-PE actuaría como donante y la Rh-PE como aceptor). La disminución de la densidad superficial de sondas como consecuencia de la fusión con bicapas carentes de ellas se traduce en una disminución lineal de la eficacia de la transferencia de energía entre las sondas.

En un tipo de medidas se han realizado espectros de fluorescencia en estado estacionario de preparaciones de vesículas y  $\alpha$ -sarcina incubadas durante 1 h en Mops 50 mM, NaCl 0.1 M, EDTA 1 mM, pH 7.0, a 37°C (42°C, para DMPS). Los medidas se realizaron según se ha descrito previamente en el apartado "Espectros de fluorescencia". Los espectros de emisión obtenidos excitando la muestra con radiación de 450 nm de longitud de onda mostraron máximos de emisión centrados alrededor de 530 nm y 585 nm, correspondientes a la emisión de NBD-PE y Rh-PE, respectivamente. La eficacia de transferencia se definió como  $(\%ET) = (1 - F/F_0) \cdot 100$  donde F y  $F_0$  son la intensidad de fluorescencia a 530 nm en presencia y en ausencia de Rh-PE, respectivamente.

De un modo similar al anterior, se ha estudiado la cinética de la mezcla de lípidos. Así, se registró la variación de la emisión de fluorescencia a 530 nm, para excitación a 450 nm, en modo continuo. En este caso, se manejó una relación vesículas marcadas a no marcadas de 1:1 (Wilschut *et al.*, 1985; Walter y Siegel, 1993); en caso de variar esta proporción se han de introducir los factores de probabilidad específicos para cada relación con el fin de corregir los porcentajes de fusión, considerando los ciclos de fusión silenciosos, esto es, ciclos que no originan variación en la señal de fluorescencia. En este caso particular, sólo la fusión entre vesículas marcadas y no marcadas produce tal variación. Considerando la definición anterior para eficacia de transferencia de energía tendríamos que

$$(\%ET)_1 = 1 - [(F_{530})_{0.6\% \text{ Rh}} / (F_{530})_{0\% \text{ Rh}}] \cdot 100$$

$$(\%ET)_2 = 1 - [(F_{530})_{0.3\% \text{ Rh}} / (F_{530})_{0\% \text{ Rh}}] \cdot 100$$

para vesículas conteniendo 1% NBD-PE y 0.6% Rh-PE y vesículas con 0.5% NBD-PE y 0.3% Rh-PE, respectivamente. La variación total de %ET en estas condiciones experimentales será:

$$\Delta ET = (\%ET)_1 - (\%ET)_2$$

Por tanto, cuando en el ensayo 1:1 se haya producido el 100% de fusión, el  $\Delta ET$  será el anterior, que se correlaciona con un  $\Delta F_{530}$  cuyo valor es:

$$\Delta F_{530} = (F_{530})_{0.3\% Rh} - (F_{530})_{0\% Rh}$$

Ahora bien, el 100% de dímeros se habrá formado cuando la variación de  $F_{530}$  sea la mitad de la anterior, ya que la probabilidad de que se produzca fusión entre vesículas que produce dilución de sondas es 0.5 (sólo entre marcadas y no marcadas). Por tanto, el 100% de dímeros se correlaciona con un  $\Delta F_{530}$  cuyo valor es:

$$\Delta F'_{530} = \Delta F_{530}/2$$

De este modo, el porcentaje de dímeros formado a un tiempo  $t$  será

$$\% \text{ dímeros} = \{[(F_{530})_t - (F_{530})_{0.6\% Rh}]/(\Delta F_{530}/2)\} \cdot 100$$

y la velocidad del proceso será

$$v = d(\% \text{ dímeros})/dt$$

Pero esta velocidad está implícitamente dividida por la concentración de lípido total en el ensayo. En efecto,  $\Delta F_{530}$  es proporcional a la concentración de lípido total (al aumentar esta concentración también aumenta la concentración de sondas y por lo tanto su intensidad de fluorescencia, si no hay efecto de filtro interno, que no lo debe haber en este intervalo de concentraciones).

Por ello si se quiere estudiar el orden de la reacción de formación de dímeros de fusión respecto a la concentración de lípido hay que anular la participación de la concentración de lípido en el valor de  $v$ , o lo que es igual, eliminar la normalización que lleva implícita. Para ello hay dos posibilidades:

- \* estudiar la variación de  $\log [v \times (\text{lípido})]$  vs  $\log [(\text{lípido})]$
- \* estudiar la variación de  $\log v'$  vs  $\log [(\text{lípido})]$  siendo

$$v' = d[(F_{530})_t - (F_{530})_{0.6\%}]/dt$$

cuya pendiente será el orden de reacción.

### Estudios de permeabilidad de membrana

Los estudios de los efectos que sobre la permeabilidad de membranas ejerce la  $\alpha$ -sarcina se han llevado a cabo midiendo la liberación del fluoróforo ácido 1-aminonaftaleno-3,6,8-trisulfónico (ANTS), previamente encapsulado junto con su apagador bromuro de N,N'-*p*-xilileno-bis piridinio (DPX), desde el interior acuoso de vesículas de fosfolípidos (Ellens *et al.*, 1985; Parente *et al.*, 1990; Murata *et al.*, 1992). El protocolo general fue el siguiente: la película de fosfolípido formada tras secar a vacío una disolución clorofórmica del mismo, se hidrata durante 1 h a 37°C en Tris 10mM, NaCl 20mM,



ANTS 12.5mM y DPX 45mM, pH 7.5, a una concentración de fosfolípido de 1mg/mL. La suspensión de vesículas multilamelares formadas de esta manera se somete a cinco ciclos de congelación descongelación con nitrógeno líquido. Se ha demostrado que este proceso incrementa la eficacia de encapsulación de solutos hidrofílicos. Así, de una situación inicial en la que no existe una distribución de equilibrio transmembranal, y la eficacia de encapsulación para el soluto es muy baja, se llega a eficacias de atrapamiento de hasta el 30% (Mayer *et al.*, 1985, 1986; Hope *et al.*, 1985). Posteriormente, esta suspensión se somete a cinco ciclos de extrusión para obtener vesículas unilamelares, tal y como se ha descrito anteriormente. La separación del material no encapsulado se realizó mediante cromatografía de penetrabilidad empleando una columna de Sephadex G-75 (Pharmacia), equilibrada en tampón Tris 10 mM, NaCl 0.1 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5. Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro SLM Aminco 8000C equipado con polarizadores Glan-Thompson (ver apartado anterior "Ensayos de mezcla de lípidos"). Los espectros de emisión de fluorescencia mostraron un máximo centrado alrededor de 510 nm. El espectro de emisión de fluorescencia de las vesículas en ausencia de  $\alpha$ -sarcina, situación considerada como 0% de liberación, se caracteriza por una fluorescencia remanente muy baja (menor del 4% de la fluorescencia correspondiente al 100% de liberación) debido a que el ANTS se encuentra apagado por el DPX en el interior de las vesículas; el 100% de liberación se consigue mediante la lisis de las vesículas con Triton X-100 1% concentración final. En esta situación el apagamiento de fluorescencia del ANTS por el DPX ha desaparecido.

### **Ensayos de mezcla de contenidos acuosos**

Los estudios de mezcla de contenidos acuosos se han realizado empleando el mismo sistema ANTS/DPX, en donde, del mismo modo que en el ensayo anterior, se registra la cinética de variación de intensidad de fluorescencia del ANTS. En este caso se preparan dos poblaciones de vesículas: i) vesículas que contienen ANTS 25 mM (la hidratación de las vesículas se realiza en tampón Tris 10 mM, pH 7.5, ANTS 25 mM, CNa 40 mM) y ii) vesículas con DPX 90 mM (el tampón de hidratación es Tris 10 mM, pH 7.5, con DPX 90 mM). Las vesículas se prepararon según el método descrito anteriormente de extrusión con filtros de 0.1  $\mu$ m de diámetro, previos ciclos de congelación-descongelación. Las vesículas así formadas se separaron del material no encapsulado mediante cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-75 (Pharmacia), equilibrado en tampón Tris 10 mM, pH 7.5, CNa 0.1 M, EDTA 1 mM. Los ensayos de mezcla de contenidos acuosos se realizaron añadiendo la proteína o péptido a una población de vesículas formada por unas conteniendo ANTS y otras DPX, en una relación (1:1). La mezcla de los contenidos acuosos de vesículas de diferente tipo determina una disminución en la intensidad de fluorescencia del ANTS debido al apagamiento ocasionado por DPX. La pérdida de la integridad vesicular tras los ciclos de fusión determina la liberación de los complejos formados, con la consiguiente recuperación de la intensidad de fluorescencia del ANTS (Düzgünes y Wilschut, 1993; Ellens *et al.*, 1985; Wilschut, 1991).

### **Medidas de dispersión de luz a 90° mediante técnicas de flujo detenido**

Las medidas de intensidad de luz dispersada a 90° fueron realizadas en un aparato de flujo detenido Hi-tech Canterbury SF-40 equipado con una fuente de luz halógena de 50 W. La longitud de onda de la radiación incidente fue de 360 nm, midiéndose la radiación dispersada con un fotomultiplicador PM-60. La constante de tiempo seleccionada

fue de 33 ms. Las disoluciones de proteína y las suspensiones de vesículas empleadas en los ensayos fueron siempre preparadas en el momento, considerando que las concentraciones efectivas eran las de la cámara de observación, es decir, las resultantes de la mezcla 1:1 de los dos medios. Las velocidades iniciales de agregación se determinaron a partir del tramo lineal de variación de la intensidad de luz dispersada (en un intervalo de 0.5 s). Los valores proporcionados son el promedio de 6 medidas secuenciales. La contribución de las vesículas por sí solas se tuvo en cuenta con los respectivos controles en ausencia de proteína.

En las medidas de intensidad de luz dispersada a  $90^\circ$  se cumple:

$$I = \beta \cdot (d\eta/dc)^2 \cdot C \cdot M \quad (a)$$

$I$ , intensidad de luz dispersada a  $90^\circ$  (en este caso, medida en voltios)

$\beta$ , constante instrumental

$\eta$ , índice de refracción

$(d\eta/dc)$ , variación del índice de refracción del disolvente producida por el soluto que produce la dispersión

$C$ , concentración en g/litro del soluto que produce la dispersión

$M$ , peso molecular del soluto

Para que esta ecuación se cumpla ha de suceder que:

1. la dependencia angular de la radiación dispersada con respecto al peso molecular del soluto que dispersa sea mínima. Esto ocurre para vesículas unilamelares monoméricas (Wei *et al.*, 1982)

2. el segundo coeficiente del virial sea cero para las vesículas y para complejos vesícula-proteína (Nelsestuen y Lim, 1977)

3. la intensidad de luz dispersada debida a la proteína libre sea muy pequeña. Para la protrombina, mayor que la  $\alpha$ -sarcina, su contribución es menor del 10% de la luz dispersada por vesículas (Nelsestuen y Lim, 1977).

Todas estas suposiciones se cumplen bien en los primeros instantes del proceso de interacción proteína vesícula. Por ello, los estudios realizados se basan en la medida de velocidades iniciales del proceso de agregación (tiempos inferiores a 1 seg).

Según la ecuación (a), manteniendo constante  $C$ , quedaría:

$$I = \alpha \cdot M \quad (b)$$

en los primeros instantes del proceso, esto es válido pues aunque pueda variar algo el peso molecular de la estructura dispersante,  $C$  no lo haría tanto ya que aparece en g/litro y no en concentración molar.

Según la ecuación b:

$$(dI/dt)_{t=0} = \alpha \cdot (dM/dt)_{t=0}$$

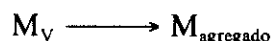
$$(I)_{t=0} = I_0 = \alpha \cdot M_v$$

siendo  $M_v$  el peso molecular de las vesículas que son el soluto dispersante a  $t=0$

$$\alpha = I_0/M_v$$

$$(dI/dt)_{t=0} = (I_0/M_v) \cdot (dM/dt)_{t=0} \quad (c)$$

El proceso de agregación de vesículas inducida por la proteína se puede considerar como:



ya que lo que se va a medir,  $I$ , depende del peso molecular de lo que dispersa. La velocidad del proceso será:

$$v = (dM/dt)_{t=0} = k \cdot C_0 \text{ velocidad inicial}$$

en donde  $k$  es la constante de velocidad del proceso y  $C_0$  la concentración en g/l de las vesículas, ya que vamos a medir intensidad de luz dispersada y ésta es proporcional a concentración en g/l y no concentración molar.

Según la ecuación c:

$$v = (dM/dt)_{t=0} = (dI/dt)_{t=0} \cdot (M_v/I_0) = k \cdot C_0$$

$$k = (dI/dt)_{t=0} \cdot (M_v/I_0) \cdot (1/C_0)$$

$$M_v/C_0 = 1/V_0$$

siendo  $V_0$  la concentración molar inicial de vesículas

$$k = (dI/dt)_{t=0} / (I_0 \cdot V_0)$$

Esta última expresión es la utilizada por Lampe *et al.* (1983)

### Calorimetría diferencial de barrido

Las medidas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se llevaron a cabo en un calorímetro Microcal MC-2 DSC (Microcal Inc.: Northampton, MA, USA) a una velocidad de barrido de 0.5°K/min (30°C/h) y una presión constante de 2 atm. La adquisición de datos así como su análisis se realizó mediante el software DA-2 y Cpcalc. Las funciones de exceso de capacidad calorífica se obtuvieron tras la sustracción de la línea base y la corrección por el tiempo de respuesta instrumental según procedimientos descritos anteriormente (López Mayorga y Freire, 1987). Todas las medidas se han realizado en tampón Mops 50 mM, pH 7.0, con NaCl 0.1M y EDTA 1 mM. Los complejos proteína-lípido se prepararon en la propia célula calorimétrica, mezclando la cantidad apropiada de cada uno de los componentes, incubándose la muestra 1 h a 37°C.

### **Encapsulación de tripsina en vesículas de fosfolípidos**

El protocolo de formación de vesículas lipídicas que contienen en su interior tripsina activa fue el siguiente: una película de lípido obtenida mediante evaporación a vacío de una disolución orgánica de asolectina o de PC de huevo fue hidratada con tampón Mops 50 mM, pH 7.0 que contiene NaCl 0.1 M y tripsina pretratada con TPCK. La concentración de lípido es de 10-20 mg/ml y la de tripsina es de 8-10 mg/ml. La hidratación se realiza a 37°C durante 1 h, agitando la disolución en vórtex hasta resuspender totalmente la película lipídica. La disolución fue posteriormente sometida a congelación con nitrógeno líquido, descongelándose posteriormente a temperatura ambiente; este proceso de congelación-descongelación se repitió 5 veces. Finalmente, esta disolución fue sometida a 5 ciclos de extrusión en un Extruder a través de 2 filtros de policarbonato de 100 nm de diámetro de poro, obteniéndose de esta forma vesículas unilamelares (ver apartado Formación de Vesículas de Fosfolípidos). El material no encapsulado se separó de las vesículas mediante cromatografía en columnas de Sephadex G-75 dispuestas en jeringuillas desechables; las vesículas se eluyeron mediante centrifugación de las mismas (500xg durante 2 min). La tripsina no encapsulada se eluyó posteriormente repitiendo el proceso.

### **Digestión trípica intravesicular de $\alpha$ -sarcina**

La digestión de  $\alpha$ -sarcina se realizó añadiendo  $\alpha$ -sarcina (10  $\mu$ g) a 0.2 ml de una disolución de liposomas que contienen tripsina en Mops 50 mM, pH 7.0, NaCl 0.1 M a una relación lípido-proteína adecuada. La presencia de inhibidor de tripsina de clara de huevo (13.6  $\mu$ M) en el exterior vesicular impide cualquier actividad trípica extravesicular. Esta disolución se incubó a 37°C parándose la digestión a los tiempos considerados mediante adición de un volumen de acetona/etanol (1:1) a -20°C. Las muestras se agitaron vigorosamente durante 15 min a 4°C, manteniéndose posteriormente a -20°C durante una noche. El precipitado de proteína libre de lípido formado de esta forma se secó y redisolvió en un volumen adecuado de tampón de aplicación de electroforesis para posterior análisis en geles de poliacrilamida al 15%. Tras la tinción de los geles éstos fueron sometidos a densitometrado en un espectrofotómetro Beckman DU-8. El área comprendida bajo el pico correspondiente a la  $\alpha$ -sarcina fue empleado para estimar el porcentaje de proteína no degradada. Los controles de 100% de degradación se obtuvieron mediante la adición de Triton X-100 (1% concentración final) a una disolución de vesículas con tripsina pero en ausencia de inhibidor en el medio extravesicular. La actividad de la tripsina empleada fue inicialmente comprobada registrando la hidrólisis del sustrato cromogénico Val-Leu-Lys-*p*-nitroanilida-2HCl mediante medidas de absorción a una longitud de onda de 405 nm.

### **Encapsulación de tRNA en vesículas de fosfolípidos**

El proceso de formación de vesículas es idéntico al descrito en el apartado anterior de Encapsulación de Tripsina en Vesículas de Fosfolípidos. En este caso, el tampón de hidratación de las vesículas contiene tRNA de levadura (Sigma; tipo X-s) a una concentración de 3-5 mg/ml. Las vesículas se separaron del material no encapsulado mediante ciclos de centrifugación a 127000xg en una Airfuge (Beckman) empleando un rotor A-95. El sedimento final fue resuspendido en un volumen adecuado de Mops 50 mM, pH 7.0, NaCl 0.1M.

### Degradación de tRNA encapsulado por $\alpha$ -sarcina

Diferentes volúmenes de una disolución de  $\alpha$ -sarcina 0.17 mM se añaden a 0.2 ml de una disolución de vesículas de asolectina o de PC de huevo en Mops 50 mM, pH 7.0, NaCl 0.1 M. La disolución se incuba durante 3 h. a 37°C tras lo cual se añade un volumen de HClO<sub>4</sub> al 10% que contiene acetato de uranilo al 0.25% (p/v) y BSA (0.2 mg/ml). La disolución resultante se mantuvo en hielo durante 30 min tras lo cual se centrifuga a 3000xg durante 20 min a 4°C. Posteriormente se mide la absorbancia a 260 nm de los sobrenadantes en un espectrofotómetro Beckman DU-7. Tal valor es función de la concentración de oligonucleótidos solubles en ácido producidos por la actividad ribonucleolítica de la  $\alpha$ -sarcina. Los blancos para estas medidas fueron muestras de vesículas tratadas de la misma forma pero a las que no se añadió proteína. Este análisis está basado en el empleado para medir actividad ribonucleasa de  $\alpha$ -sarcina frente a RNA purificado de levadura (Martínez del Pozo *et al.*, 1989).

### Fotomarcaje de $\alpha$ -sarcina

La formación de vesículas con fosfolípidos fotoactivables para posterior fotomarcaje de  $\alpha$ -sarcina se llevó a cabo bajo luz roja de la siguiente forma: en primer lugar, se formó una película lipídica mediante evaporación en corriente de nitrógeno de una mezcla de lípidos en cloroformo:metanol 1:1 (v/v) más las sondas PCI (1-palmitoil-2-(2-azido-4-nitrobenzoyl)-*sn*-glicero-3-[<sup>3</sup>H]fosfocolina) y PC2 (1-miristoil-2-[12-(4-azido-2-nitrofenil)amino]dodecanoil-*sn*-glicero-3-[<sup>14</sup>C]-fosfocolina). A continuación las películas se redisolviéron en dietiléter, volviéndose a secar posteriormente en corriente de nitrógeno. La relación molar PCI/lípido total fue de 0.006%, siendo la radiactividad total de 5 x 10<sup>5</sup> dpm; para la sonda PCII la relación molar fue de 0.018% y la radiactividad fue 1 x 10<sup>5</sup> dpm. Tras la eliminación de las trazas orgánicas la mezcla lipídica se disolvió en tampón Mops 50 mM, pH 7.0, NaCl 0.1 M, sometándose a sonicación en baño durante 30 min a una temperatura superior a la de transición de fase del lípido. Los complejos  $\alpha$ -sarcina lípido se formaron por adición de  $\alpha$ -sarcina (20  $\mu$ g) a la disolución de vesículas marcadas, incubándose la mezcla durante 1h a 37°C. A continuación las muestras se irradiaron con una lámpara UV de larga longitud de onda UVL-56 Ultraviolet Products (Montecucco, 1988) durante 10 min a temperatura ambiente y con un filtro de cristal. La proteína se recuperó mediante extracción con etanol al 70% para posterior análisis en PAGE-SDS. A continuación los geles se dividieron en rodajas de 2 mm de espesor, que se incubaron independientemente durante 12 h con 300  $\mu$ l de solubilizador de tejidos Packard Soluene 350. El conteo de radiactividad se realizó en un contador de centelleo Beckman LS-3801, tras la adición de 4 ml de líquido de centelleo Packard Instagel e incubación durante 6 h.

### Microscopía electrónica

Las vesículas de fosfolípidos se preparan como se ha indicado anteriormente (véase Formación de Vesículas Lipídicas) a una concentración de 2.5 mg/ml. Las mezclas péptido-vesículas se preparan por incubación de la correspondiente cantidad de cada uno de ellos, según se indica en cada caso. Sobre una gota de la muestra a analizar se deposita una rejilla de cobre recubierta de Formvar-carbono, sobre la que previamente se realizó una descarga eléctrica en un "glow-discharge". El sistema se mantiene en estas condiciones durante 2 min, tras lo que se procede a secar el exceso de muestra con un papel de filtro. La rejilla con la muestra se incuba con ácido fosfotúngstico al 2%

(peso:volumen), pH 7.0 durante 5 min. Tras secar la rejilla se observa en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 902 (Jena, Alemania).

### **Reducción y carboxiamidometilación de $\alpha$ -sarcina**

Los puentes disulfuro de la  $\alpha$ -sarcina se redujeron y carboxiamidometilaron del siguiente modo: una disolución de  $\alpha$ -sarcina (10 mg/ml) en tampón de desnaturalización (Tris-HCl 1.0 M, EDTA 2 mM, cloruro de guanidinio 6 M, pH 8.0) se mantiene a 37°C durante 1 h, tras lo cual se añade ditioneol sólido hasta una concentración final de 25 mM (exceso 10 veces molar sobre residuos de cisteína). Tras ser gaseada con nitrógeno, la disolución se mantiene a 37°C durante 90 min. Finalmente, y tras añadir iodoacetamida sólida hasta una concentración final de 250 mM, la disolución se incuba en oscuridad a 37°C durante 60 min. La proteína así tratada se purifica mediante una cromatografía de penetrabilidad en una columna de Biogel P2 (2 x 15 cm) equilibrada en ácido acético 50 mM. Las fracciones con proteína se recogen y se liofilizan. La extensión de la modificación se verifica mediante análisis de aminoácidos.

### **Análisis de aminoácidos**

Los análisis de aminoácidos se han llevado a cabo con un analizador automático Beckman Model 6300. Las muestras se hidrolizaron en HCl 5.7 N con fenol 0.1 % (p/v) (0.2 ml volumen total) durante 24 h a 110°C, en tubos Pyrex cerrados a vacío. Tras este proceso, las muestras se secan a vacío con un sistema de centrifugación a vacío Speed-Vac (Savant), lavándose posteriormente dos veces con 0.2 ml de agua destilada. Los hidrolizados secos se disolvieron en 50  $\mu$ l de tampón Na-S (Beckman).

### **Digestiones proteolíticas**

Digestión por clostripaína: previamente a la digestión, la enzima ha de activarse incubándola durante 2-3 h en ditioneol (DTT) 7.6 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.03 mM (Giles *et al.*, 1979). Posteriormente, la  $\alpha$ -sarcina, o cualquier forma modificada de la misma, se disuelve en Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, DTT 1 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM, pH 7.0, a una concentración de 1-5 mg/ml. La enzima se añade a esta disolución a una relación proteína-enzima de 50:1, manteniéndose la digestión durante 5 h a 37°C.

Digestión por tripsina: la proteína a digerir se disuelve en Tris 50 mM (o Mops 50 mM), NaCl 0.1 M, pH 7.5, a una concentración comprendida entre 1-5 mg/ml. La tripsina, disuelta en el mismo tampón a una concentración de 1 mg/ml, se añade a la anterior disolución de modo que se obtenga una relación 50:1 (proteína/enzima). La digestión se mantiene a 37°C durante un mínimo de 3 h.

### **Ensayo de actividad ribonucleasa de la $\alpha$ -sarcina**

La actividad ribonucleasa específica de la  $\alpha$ -sarcina se ha puesto de manifiesto mediante un ensayo que hace uso de un lisado de reticulocitos de conejo (Promega), tal y como se ha descrito previamente (Lamy y Davies, 1991; Lacadena *et al.*, 1994). Este lisado (50  $\mu$ l) fue tratado con  $\alpha$ -sarcina nativa, o con  $\alpha$ -sarcina modificada químicamente (40 ng), en tampón Tris-HCl 40 mM, KCl 40 mM, EDTA 10 mM, pH 7.5, durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción se paró por la adición de 0.25 ml de Tris-HCl

50 mM, SDS 0.5% (p/v), pH 7.5, incubándose la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente. La extracción de RNA se realizó con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1) y, posteriormente, precipitada con etanol. Este RNA se analizó en geles de agarosa al 2.4% y se reveló por tinción con bromuro de etidio de acuerdo con protocolos estándar.

### **Alineamiento y comparaciones de secuencias de aminoácidos. Predicción de estructuras secundarias**

Los alineamientos y comparaciones de secuencias de residuos de aminoácidos se han llevado a cabo de acuerdo al algoritmo desarrollado por Needleman y Wunsch empleando el programa ALIGN (Doolittle y Feng, 1990). La predicción de estructuras secundarias se ha basado en las secuencias de aminoácidos previamente descritas. La predicción de giros  $\beta$  se ha llevado a cabo según Chou y Fasman (1978) y Gavilanes *et al.* (1984). Los elementos estructurales de  $\alpha$ -hélice y estructura  $\beta$  se han predicho según el método de Gibrat *et al.* (1987). Los árboles filogenéticos se han construido considerando la matriz de distancia y el orden de ramificación de acuerdo al programa PAPA (Doolittle y Feng, 1990). Los perfiles de flexibilidad se han obtenido utilizando los parámetros aportados por Karplus y Schulz (1986) de acuerdo al programa EPILOT (Menéndez Arias y Rodríguez, 1990). El alineamiento de estructuras de proteínas fue realizado con el programa Insight II de BIOSYM manejando las coordenadas de las correspondientes estructuras cristalinas obtenidas del Banco de Datos de Proteínas del Laboratorio Nacional de Brookhaven (Protein Data Bank) (Berstein *et al.*, 1977; Abola *et al.*, 1987).

### **Determinación de los contenidos de estructura secundaria a partir de los espectros de CD y de FTIR**

Los cálculos de los diferentes porcentajes de estructura secundaria de proteínas o péptidos a partir de espectros de dicroísmo circular se han llevado a cabo empleando el método CCA ("convex constraint analysis") de Perczel *et al.* (1991). Dicho método no hace uso de datos referentes a estructuras proteicas determinadas mediante difracción de rayos-X, así como de espectros de referencia. La desconvolución de los espectros experimentales proporciona espectros componentes básicos prácticamente idénticos a los considerados como tales y que se han derivado de estudios de polipéptidos modelo de estructura conocida.

La determinación de estructuras secundarias a partir de la banda amida I' de los espectros de infrarrojo se ha llevado a cabo según Goormaghtigh *et al.* (1990, 1993). Brevemente, la región correspondiente a la banda amida I' del espectro se somete a desconvolución de Fourier empleando una curva Lorentziana para la desconvolución y una Gaussiana para la apodización (Kauppinen *et al.*, 1981). La evaluación cuantitativa de los diferentes componentes de la banda amida I' (exclusivamente el intervalo comprendido entre los números de onda  $1700\text{ cm}^{-1}$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$ ) revelados por la desconvolución se llevó a cabo empleando un ajuste iterativo de mínimos cuadrados a curvas Lorentzianas. Previamente al ajuste, se sustrae la línea base (una línea que conecta a través de las ordenadas a  $1700\text{ cm}^{-1}$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$ ). Los parámetros iniciales del ajuste son los especificados en Goormaghtigh *et al.* (1990). La proporción de una estructura secundaria particular se considera como la proporción entre el área de las bandas cuyos máximos se

encuentran localizados en la región que se asigna a tal estructura y el área resultante de la suma de todas las bandas individuales cuyos máximos se encuentren entre 1689  $\text{cm}^{-1}$  y 1615  $\text{cm}^{-1}$ .

### Síntesis y purificación del péptido $\alpha$ S(116-139)

El péptido ha sido sintetizado con el extremo C-terminal en forma de amida en un sintetizador de péptidos automático múltiple (AMS 422, Abimed) empleando procedimientos de síntesis de fase sólida y química estándar Fmoc en una base de 25  $\mu\text{moles}$ . La síntesis se llevó a cabo en una resina N- $\alpha$ -Fmoc-DMP [(4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-amino-metil)-fenoxi] (Novabiochem), con aminoácidos Fmoc-protegidos activados *in situ* con PyBOP (benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidinofosfonio hexa-fluorofosfato) en presencia de N-metil morfolina y 20% piperidina/dimetilformamida para la desprotección. Los grupos de protección para las cadenas laterales son: tBu (serina, treonina y tirosina), pmc (arginina), Trt (cisteína e histidina) y Boc (lisina). El péptido fue liberado de la resina con etanoditiol al 2.5% (King *et al.*, 1990) como secuestrante, precipitado y lavado con metil-*tert*-butil éter, extraído con agua y liofilizado. El péptido fue posteriormente sometido a purificación mediante técnicas de HPLC de fase invertida en una columna Ultrasphere-ODS  $\text{C}_{18}$  (10x150 mm) con un gradiente lineal agua/acetonitrilo 35%, ambos con ácido trifluoroacético (0.1%). El peso molecular estimado mediante espectrometría de bombardeo atómico fue 2660, siendo el teórico 2659. La composición de aminoácidos del péptido purificado se correspondió con la teórica. La concentración de péptido se determinó mediante análisis de aminoácidos y por medidas de absorción a 278 nm, empleando un coeficiente de extinción molar a pH 7.0 de 2700  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Los análisis de aminoácidos se llevaron a cabo como se ha indicado anteriormente.

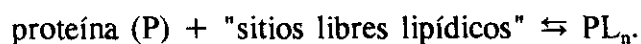


## **RESULTADOS Y DISCUSION**

## 1. AGREGACION Y MEZCLA DE LIPIDOS DE VESICULAS DE DIMIRIS-TOILFOSFATIDILSERINA POR $\alpha$ -SARCINA

### Unión de $\alpha$ -sarcina a vesículas compuestas por DMPS

La unión de la toxina  $\alpha$ -sarcina a vesículas unilamelares grandes de DMPS se ha estudiado mediante ultrafiltración y ultracentrifugación. Los resultados obtenidos en ambos casos son comparables, lo cual significa que la interacción entre proteína y vesícula no se ve afectada significativamente por ambos procesos. Los datos de unión han sido analizados considerando la existencia de un equilibrio de interacción como el indicado (Gasset *et al.*, 1989):

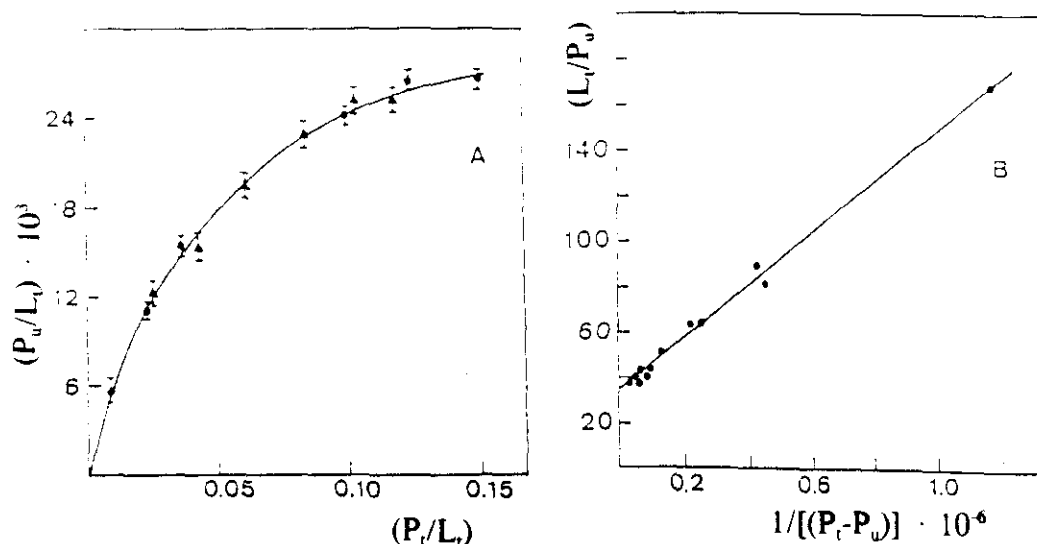


Este modelo de unión considera la existencia de una constante de disociación aparente,  $K_d$  y un parámetro,  $n$ , que definiría el número de moléculas de fosfolípido que se ven afectadas por molécula de proteína. La ecuación que relaciona estos parámetros es:

$$L_t/P_u = K_d \cdot n/(P_t - P_u) + n$$

en donde  $P_u$  y  $P_t$  son la concentración de proteína unida y total, respectivamente; mientras que  $L_t$  es la concentración total de lípido. La representación de  $(L_t/P_u)$  frente a  $1/(P_t - P_u)$  permite calcular  $K_d$  y  $n$  (figura 1). Los valores de estos parámetros derivados de las medidas de unión realizadas a 42°C, temperatura superior a la de transición de fase de la DMPS, son:  $K_d = 3 \cdot 10^{-6}$  M, y  $n = 37$ . Del análisis realizado a una fuerza iónica elevada, 0.3 M NaCl, se deduce que no hay unión de la proteína a las vesículas en el intervalo de relaciones molares proteína/lípido estudiado. Este mismo estudio se ha llevado a cabo con vesículas mixtas compuestas por DMPG y DMPS a una relación molar 1:1. Los parámetros obtenidos mediante un análisis como el anterior son  $n = 54$  y  $K_d = 1.9 \cdot 10^{-6}$  M.

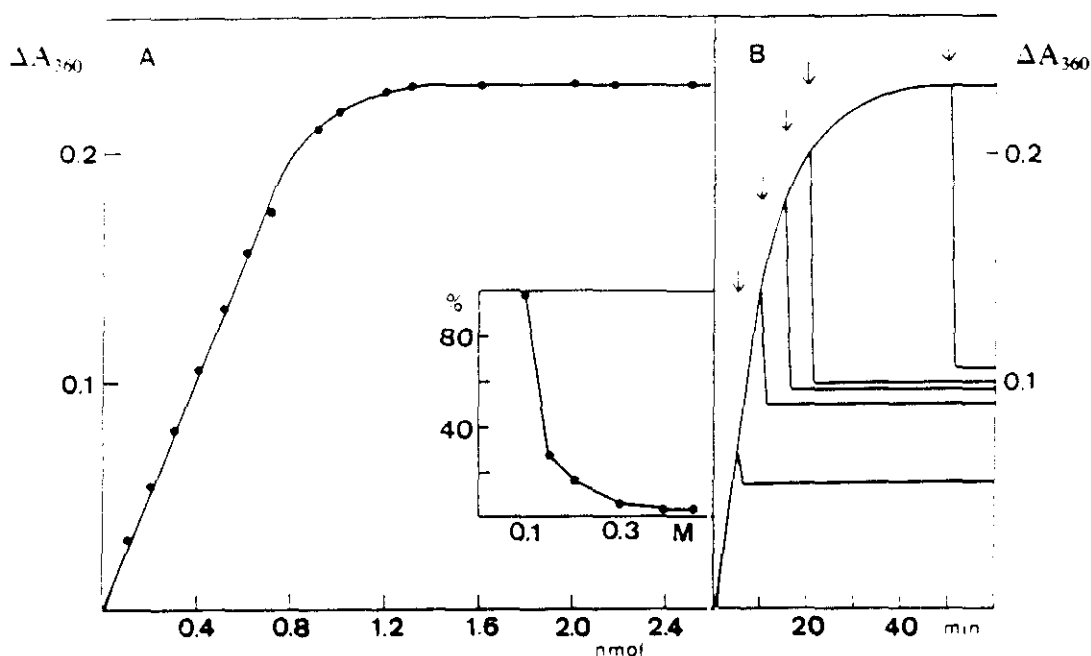
Cabe decir que la definición de sitio lipídico de unión, es puramente operativa; el número  $n$  que lo caracteriza da idea del número medio de lípidos que se ven modificados por molécula de proteína, por lo que, como tal, el "sitio de unión" no se constituye como una realidad física definida.



**Figura 1. Unión de  $\alpha$ -sarcina a vesículas unilamelares de DMPS.** (A) Representación de la relación entre proteína unida y lípido total ( $P_u/L_t$ ) frente a la relación proteína total y lípido total ( $P_t/L_t$ ). Los círculos (●) representan resultados obtenidos mediante ensayos de ultrafiltración, mientras que los triángulos (▲) son los obtenidos mediante ultracentrifugación. (B) Análisis de los datos de acuerdo a la ecuación  $L_t/P_u = K \cdot n/(P_t - P_u) + n$

#### Agregación de vesículas de DMPS por $\alpha$ -sarcina

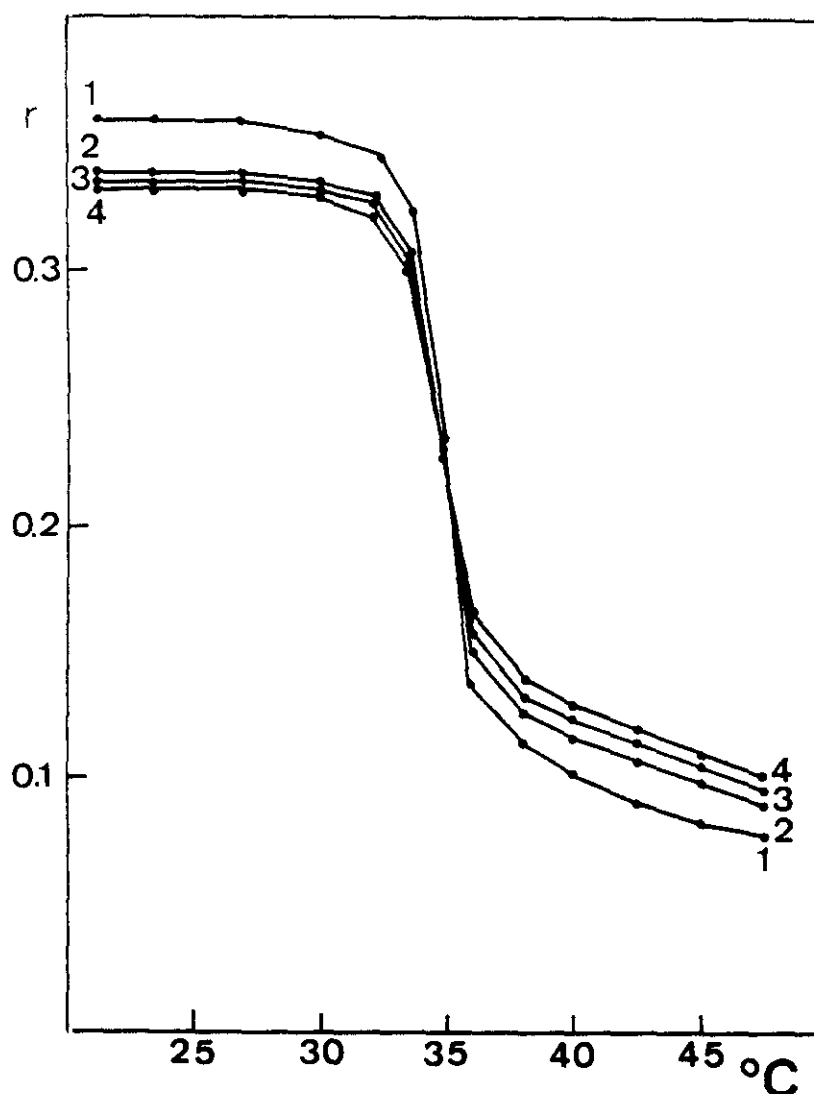
Tras el proceso de unión a las vesículas, la  $\alpha$ -sarcina agrega las vesículas de DMPS según se deduce del aumento de la absorción aparente a 360 nm ( $\Delta A_{360 \text{ nm}}$ ) de una dispersión de vesículas tras la adición de la proteína. Como puede verse en la figura 2 el  $\Delta A_{360 \text{ nm}}$  es dependiente del tiempo y de la relación proteína-DMPS. El tiempo que se requiere para completarse la reacción es de 40 min para la menor relación proteína/lípido empleada, produciéndose el 80% del aumento en los primeros 20 min. El máximo incremento de absorción se produce a una relación 35:1 (DMPS/ $\alpha$ -sarcina), resultado que coincide con la máxima capacidad de las vesículas de unir  $\alpha$ -sarcina según se deriva de los resultados anteriores de unión.



**Figura 2. Agregación de vesículas de DMPS inducida por  $\alpha$ -sarcina.** (A) Aumento de la absorción a 360 nm producido por la interacción de  $\alpha$ -sarcina con vesículas de DMPS. La titulación de las vesículas de DMPS (30 nmoles totales de fosfolípido) se realizó en tampón Mops 50 mM, pH 7.0 conteniendo NaCl 0.1 M, EDTA 1mM, a 42°C. La mezcla de reacción (1 ml) se analizó en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Se representan los incrementos de absorción a 360 nm para cada relación proteína/lípido ( $\Delta A_{360 \text{ nm}}$ ) se representan frente a los nmoles de proteína añadida. Los resultados son los promedios de tres ensayos independientes. Recuadro: porcentaje de variación de absorción a 360 nm a diferentes concentraciones de NaCl correspondientes a una relación molar DMPS/ $\alpha$ -sarcina (30:2). La normalización se realiza considerando el incremento producido obtenido a 0.1 M NaCl como 100%. (B) Efecto de la fuerza iónica sobre la cinética de variación de absorción a 360 nm tras la interacción entre  $\alpha$ -sarcina y vesículas de DMPS. La mezcla de reacción contiene vesículas de DMPS (30 nmoles de fosfolípido total) y 2.2 nmoles de  $\alpha$ -sarcina en tampón Mops 50 mM, pH 7.0 con NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM. A los correspondientes tiempos, indicados mediante flechas, se añaden 30  $\mu$ l de una disolución concentrada de NaCl de modo que se incrementa su concentración en el medio hasta 0.4 M.

La agregación de vesículas de DMPS es dependiente de la fuerza iónica del medio (figura 2, recuadro), de modo que un aumento en esta última inhibe el proceso de agregación. De hecho, el máximo  $\Delta A_{360 \text{ nm}}$  producido a 0.3 M NaCl es un 5% del que se produce a 0.1 M. Considerando los anteriores resultados de unión a 0.3 M NaCl ha de

concluirse que la inhibición de la agregación es consecuencia de la ausencia de unión de  $\alpha$ -sarcina a vesículas; es decir, la inhibición no se produce en etapas posteriores de interacción entre complejos proteína-vesícula. Este comportamiento es característico de un proceso de agregación para el que las interacciones electrostáticas son esenciales. Ahora bien, tal y como se pone de manifiesto en la figura 2B, los complejos  $\alpha$ -sarcina-DMPS no se disocian completamente cuando la fuerza iónica del medio se incrementa hasta un valor de 0.4 M NaCl por adición de un pequeño volumen de una disolución concentrada



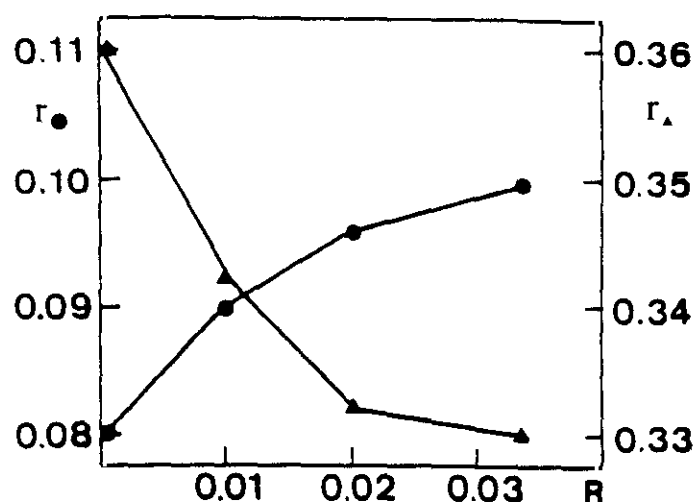
**Figura 3. Variación de la anisotropía de fluorescencia ( $r$ ) de vesículas de DMPS marcadas con DPH frente a la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).** Los perfiles de transición de fase corresponden a diferentes relaciones molares lípido/proteína: (1) DMPS; (2) 100:1; (3) 50:1; (4) 30:1. Los estudios se llevaron a cabo en Mops 50 mM, pH 7.0 conteniendo NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM. La concentración total de fosfolípido fue de 80  $\mu\text{g/ml}$ . La sonda fluorescente DPH se encontraba a una relación DPH/DMPS de 1:1000 en peso. Los valores de anisotropía determinados para cada temperatura se determinaron tras estabilizarse la muestra 10 min a dicha temperatura. Los valores representan el promedio de tres determinaciones independientes.

de NaCl (30  $\mu$ l en 1 ml total). Es más, la reversión progresivamente disminuye a medida que la agregación tiene lugar. En conjunto, este resultado indicaría que tras una primera etapa de interacción electrostática entre  $\alpha$ -sarcina y DMPS, se producirían interacciones no reversibles por fuerza iónica.

La adición de  $\alpha$ -sarcina a complejos preformados  $\alpha$ -sarcina-DMPS estables en condiciones saturantes lípido/proteína no induce cambios en la absorción de la muestra. Sin embargo, la adición de vesículas, hasta alcanzar el doble de la concentración inicial, determina un nuevo aumento en la absorción aparente (un 60% del inicial aproximadamente). Estos resultados indicarían que en condiciones saturantes lípido/proteína no existen vesículas libres, aunque sí se pueden incorporar nuevas vesículas a los complejos.

### **Efecto de la $\alpha$ -sarcina sobre el comportamiento termotrópico de DMPS**

Se han estudiado los efectos que tiene la  $\alpha$ -sarcina sobre la transición de fase entre el estado gel y líquido cristalino de la DMPS con la finalidad de un posterior análisis de la interacción  $\alpha$ -sarcina-DMPS. Este estudio se ha realizado empleando las sondas fluorescentes DPH y TMA-DPH, que registrarían los efectos de la proteína a nivel de la región de las cadenas de acilo de las bicapas y a nivel de la región de las cabezas polares, respectivamente (Lentz *et al.*, 1976; Prendergast *et al.*, 1981). En la figura 3 aparece un resumen de los resultados obtenidos a diferentes relaciones molares DMPS/ $\alpha$ -sarcina, empleando la sonda DPH (los resultados obtenidos con la sonda TMA-DPH son similares). La proteína disminuye la amplitud de la transición sin modificar la temperatura de la misma ( $T_m$ ), 35°C en nuestras condiciones experimentales, hasta una relación saturante (30:1) DMPS/ $\alpha$ -sarcina. La proteína afecta al estado físico de los lípidos tanto por encima como por debajo de la temperatura de transición (figura 4). El grado de anisotropía de fluorescencia de ambas sondas disminuye a una temperatura inferior a la  $T_m$ , es decir, cuando el fosfolípido se encuentra en estado gel, mientras que aumenta en estado líquido cristalino. Esto es, la  $\alpha$ -sarcina aumenta el orden de las moléculas de fosfolípido cuando éste se encuentra en estado líquido cristalino, mientras que lo disminuye cuando se encuentra en estado gel. Estos resultados pueden interpretarse como producto de una penetración de la  $\alpha$ -sarcina en la bicapa mediante interacciones hidrofóbicas. Este mismo estudio se ha realizado a alta fuerza iónica (0.3 M NaCl). En este caso, la  $\alpha$ -sarcina no modifica el comportamiento termotrópico de la DMPS, lo cual está de acuerdo con la ausencia de unión en estas mismas condiciones.

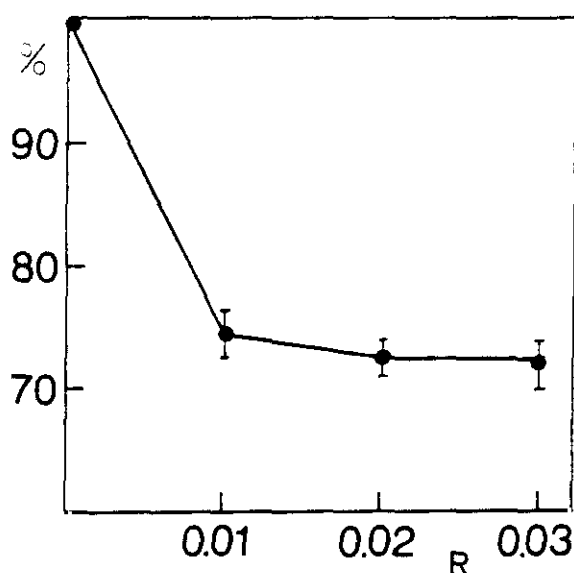


**Figura 4.** Variación de la anisotropía de fluorescencia ( $r$ ) de vesículas de DMPS marcadas con DPH frente a la relación molar  $\alpha$ -sarcina/DMPS ( $R$ ). Los valores de anisotropía de fluorescencia de DPH por encima ( $\bullet$ ) y por debajo ( $\blacktriangle$ ) de la temperatura de transición de fase del fosfolípido puro ( $35^{\circ}\text{C}$ ) se representan frente a la relación molar  $\alpha$ -sarcina/DMPS ( $R$ ).

El efecto de la  $\alpha$ -sarcina sobre el comportamiento termotrópico de DMPS se ha estudiado también mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). La proteína disminuye aproximadamente en un 30% el  $\Delta H$  asociado a la transición térmica, sin variar la  $T_m$  (figura 5), lo cual estaría de acuerdo con los resultados obtenidos mediante los estudios de anisotropía de fluorescencia.

La  $\alpha$ -sarcina desestabiliza las membranas de DMPS, induciendo mezcla de lípidos entre diferentes vesículas tal y como se deduce de los ensayos de variación de transferencia de energía. Así, la adición de  $\alpha$ -sarcina a una mezcla de vesículas compuesta por vesículas marcadas con las sondas fluorescentes NBD-PE y Rh-PE y vesículas sin marcaje a una relación molar (1:9), produce un aumento de la intensidad de fluorescencia del NBD-PE (donante) y simultáneamente una disminución de la intensidad de fluorescencia de la Rh-PE (aceptor) (figura 6). La disminución en la transferencia de energía es dependiente de la concentración de  $\alpha$ -sarcina (figura 7). El porcentaje de transferencia de energía (%ET) disminuye desde un 80% inicial hasta un 25% a una relación molar DMPS/ $\alpha$ -sarcina de 140:1. Dicha disminución corresponde a una dilución de la densidad superficial del aceptor de 10 veces (recuadro figura 7). La adición de  $\alpha$ -sarcina a una

población de vesículas marcadas fluorescentemente no produce cambio alguno en la señal de fluorescencia, por lo que, en principio, los cambios en el tamaño de las vesículas tras la interacción con  $\alpha$ -sarcina, no interfieren en la medida. Lo mismo podría decirse de la posible dispersión provocada por la turbidez de la muestra. De todo ello se deriva que la variación en la señal de fluorescencia es debida a una mezcla de lípidos entre distintas vesículas y posterior difusión de las sondas fluorescentes en el plano de las vesículas resultantes.

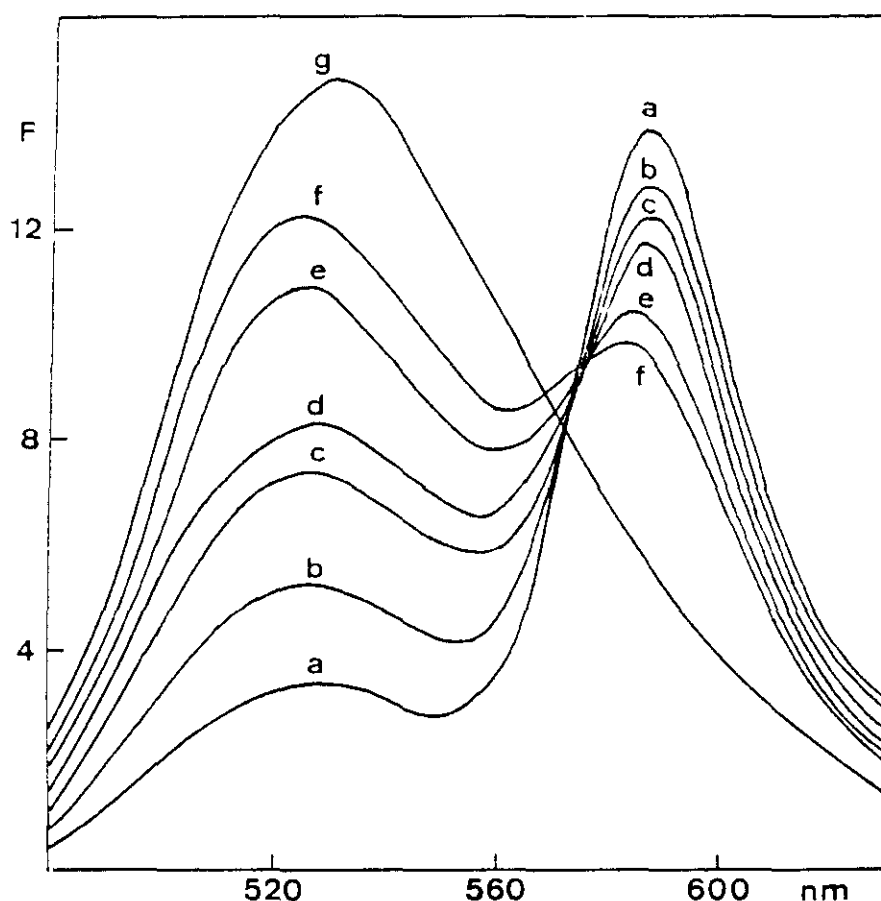


**Figura 5. Variación relativa del incremento de entalpía ( $\Delta H$ ) frente a la relación molar  $\alpha$ -sarcina/DMPS ( $R$ ).** Los valores de  $\Delta H$  se han calculado como el área bajo el pico de variación de la capacidad calorimétrica con la temperatura asociada a la transición de fase de la DMPS. Los valores se han referido al obtenido con DMPS en ausencia de proteína. Las muestras se prepararon en tampón Mops 50 mM, pH 7.0, conteniendo NaCl 0.1 M y EDTA 1mM. Los valores representan el promedio de tres mediciones independientes.

La existencia de mezcla de lípidos entre diferentes vesículas puede derivarse asimismo de medidas de polarización de fluorescencia de una población de vesículas de DMPG y DMPS ambas marcadas con DPH. La figura 8 muestra la transición de fase de una disolución de dichas vesículas a una relación molar (1:1). Se observan dos transiciones, la primera de las cuales es debida a las vesículas de DMPG ( $T_m = 23^\circ\text{C}$ ) y la segunda a las de DMPS ( $T_m = 35^\circ\text{C}$ ). La adición de  $\alpha$ -sarcina elimina este comportamiento determinando la aparición de una única transición con una  $T_m = 28^\circ\text{C}$  (figura 8), lo cual correspondería a una bicapa mixta DMPG-DMPS. Cuando en este mismo sistema



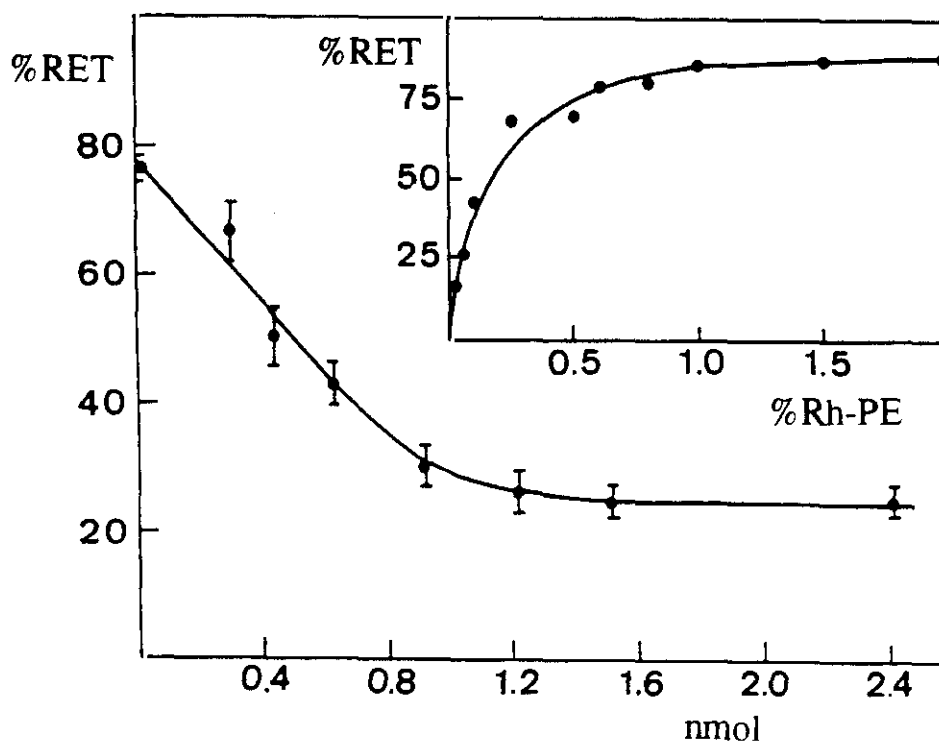
se emplean relaciones no saturantes de  $\alpha$ -sarcina/lípido se observa, junto a la principal transición correspondiente a las vesículas mixtas, una pequeña transición que correspondería a vesículas de DMPS. Cuando el sistema está compuesto por vesículas de DMPS y vesículas de DMPC no se observa la aparición de una transición intermedia lo cual está de acuerdo con la ausencia de interacción con fosfolípidos neutros (Gasset *et al.*, 1989).



**Figura 6. Efecto de la  $\alpha$ -sarcina sobre la variación de transferencia de energía entre las sondas NBD-PE Y Rh-PE incorporadas en vesículas de DMPS.** Se mezclaron vesículas de DMPS marcadas con las sondas fluorescentes NBD-PE y Rh-PE (a una relación molar DMPS/NBD-PE/Rh-PE de 98:1:0.6) con vesículas no marcadas a una relación (1:9) en tampón Tris 50 mM, pH 7.0 conteniendo NaCl 0.1 M y EDTA 1mM. La concentración total de lípido es de 142  $\mu$ M. A esta población de vesículas se añade  $\alpha$ -sarcina hasta alcanzar diferentes relaciones lípido/proteína: (a) sin  $\alpha$ -sarcina; (b) 475:1; (c) 325:1; (d) 230:1; (e) 155:1; (f) 95:1; (g) 60:1. El espectro (g) es el obtenido con vesículas compuestas por DMPS/NBD-PE (100: 0.1). Los espectros de emisión se obtuvieron tras incubación la muestra 60 min a 42 °C, empleando una longitud de onda de excitación de 450 nm. La intensidad de fluorescencia (F) se expresa en unidades arbitrarias.

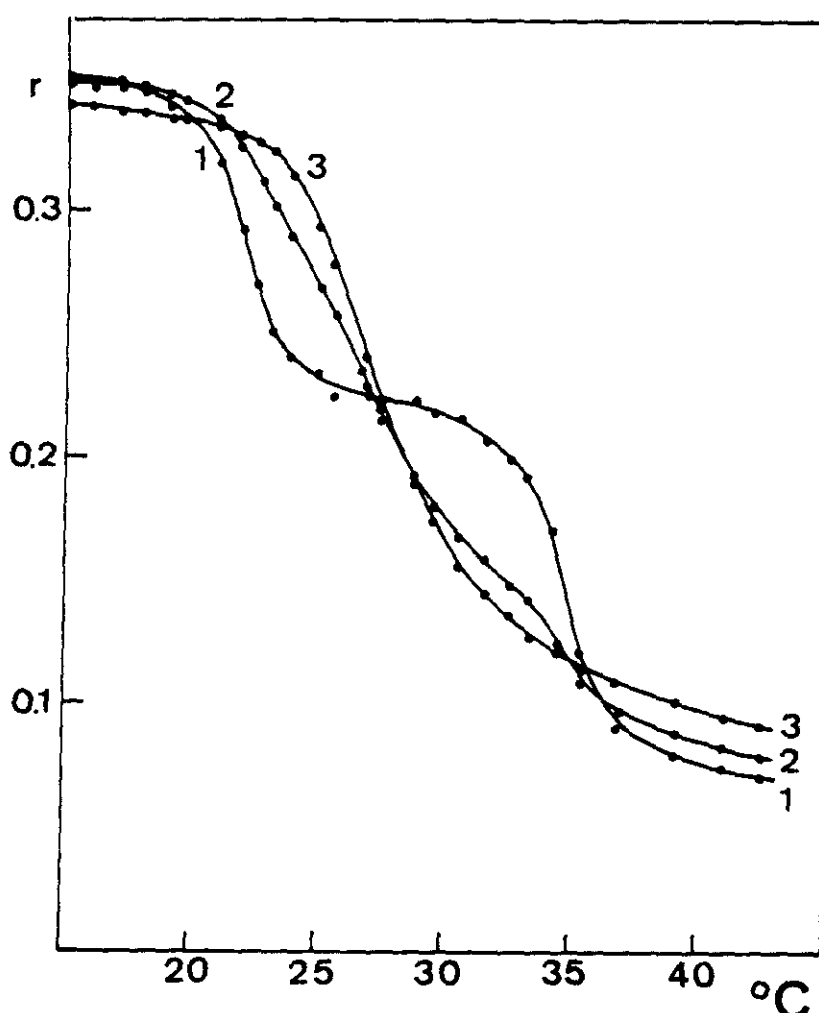
## DISCUSION

Los resultados obtenidos demuestran que la toxina  $\alpha$ -sarcina interacciona con vesículas unilamelares grandes de DMPS a pH neutro y baja fuerza iónica 0.1 M NaCl, produciendo su agregación y mezcla de lípidos. Las primeras etapas de la interacción son esencialmente de carácter electrostático, tal como lo demuestra la dependencia de la unión con la fuerza iónica. Los ensayos de unión llevados a cabo a 0.3 M NaCl indican la ausencia de unión. Los procesos derivados de la interacción entre la  $\alpha$ -sarcina y vesículas, evidentemente, no se observan en estas condiciones; no se observa agregación ni mezcla de lípidos, así como efectos sobre el comportamiento termotrópico. Sin embargo, la interacción entre la citotoxina y las vesículas de DMPS no es exclusivamente de carácter



**Figura 7. Mezcla de lípidos entre vesículas de DMPS inducida por  $\alpha$ -sarcina.** Efecto de la  $\alpha$ -sarcina sobre el porcentaje de transferencia de energía (%ET) entre las sondas NBD-PE Y Rh-PE (ver parte experimental) frente a la concentración de  $\alpha$ -sarcina (nmoles/ml). Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron tras incubar la muestra 60 min a 42 °C. La concentración total de DMPS es 142  $\mu$ M. Recuadro: variación del porcentaje de transferencia de energía entre las sondas NBD-PE y Rh-PE frente a la densidad superficial de Rh-PE. Las medidas han sido realizadas a una concentración constante de 1%.

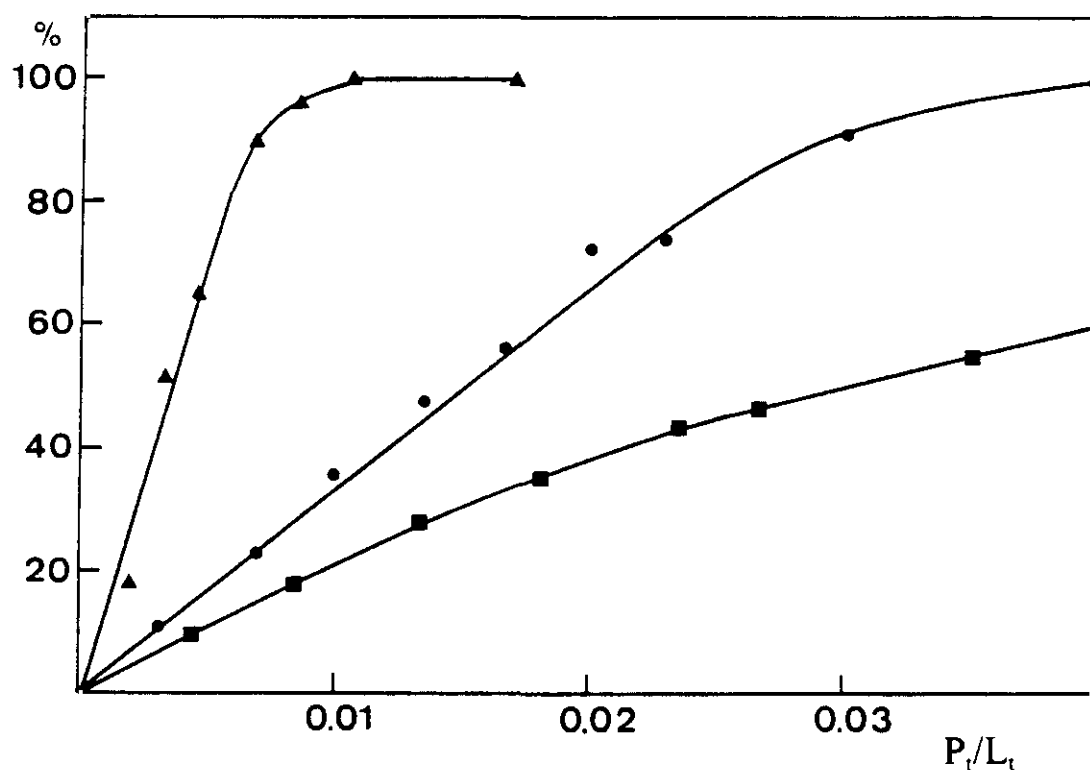
electrostático, como lo demuestra el hecho de que una vez producida la interacción ésta no revierte totalmente al aumentar la fuerza iónica. En este sentido, el  $\Delta A_{360\text{ nm}}$  producido como consecuencia de la agregación de vesículas de DMPS por la  $\alpha$ -sarcina no alcanza línea base tras aumentar la fuerza iónica hasta 0.3 M NaCl. Asimismo, la existencia de interacciones no iónicas se deduce de los efectos que ejerce la proteína sobre la transición térmica de los lípidos entre la fase gel y líquido cristalino. La disminución de la amplitud de la transición ha de interpretarse como que un porcentaje de moléculas de fosfolípido no participan en la transición cooperativa.



**Figura 8. Variación de anisotropía de fluorescencia DPH de vesículas de DMPS-DPH y vesículas de DMPG-DPH.** Perfiles de transición de fase de una disolución de vesículas formada por vesículas de DMPS y vesículas de DMPG a una relación molar (1:1). Las relaciones molares lípido/proteína fueron: (1) en ausencia de  $\alpha$ -sarcina; (2) 100:1; (3) 30:1. Los análisis se llevaron a cabo en tampón Mops 50 mM, pH 7.0, conteniendo NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM.

La existencia de mezcla de lípidos entre diferentes vesículas de DMPS inducido por la  $\alpha$ -sarcina conlleva necesariamente una previa desestabilización de membranas, lo cual sugiere fuertemente la presencia de interacciones no iónicas. Estos resultados son cualitativamente iguales a los obtenidos con el fosfolípido DMPG (Gasset *et al.*, 1989, 1990).

La similitud de efectos producidos por la  $\alpha$ -sarcina sobre las vesículas de DMPG y de DMPS se pueden explicar considerando el carácter ácido de ambos fosfolípidos,



**Figura 9.** Efectos producidos por  $\alpha$ -sarcina en vesículas de DMPS a diferentes relaciones proteína/lípido ( $P_t/L_t$ ). (■) Unión, (●) agregación y (▲) mezcla de lípidos. Los valores se expresan como porcentajes (%) de: la máxima unión observada, la máxima agregación (calculada a partir del máximo aumento de absorción a 360 nm) y máxima mezcla de lípidos (calculada a partir de la máxima disminución de la transferencia de energía).

ambos poseen la misma carga neta, así como teniendo en cuenta que poseen la misma forma y tamaño. Sin embargo, la constante de disociación derivada de los ensayos de unión es diferente para uno y otro:  $3 \cdot 10^{-6}$  M para DMPS y  $6 \cdot 10^{-8}$  M para DMPG. Estas constantes de disociación aparentes se han calculado considerando la situación de equilibrio "proteína libre" + "sitios lipídicos de unión"  $\rightleftharpoons$  "proteína unida". Se puede argumentar que este formalismo es esencialmente válido para la unión de proteínas extrínsecas a la superficie de membranas, ya que el equilibrio considera que la proteína se intercambia entre los sitios lipídicos y la fase acuosa. Sin embargo, en la interacción entre  $\alpha$ -sarcina y lípidos existe un componente hidrofóbico, relacionado con la inserción de la proteína en la bicapa. Independientemente de este razonamiento, este tratamiento resulta útil en términos comparativos, aportando diferencias en cuanto a la afinidad de la proteína frente a DMPS y DMPG. Existen, por todo ello, otros factores que intervienen en la interacción aparte de los puramente electrostáticos.

Ambos fosfolípidos poseen la mismas cadenas de acilo y carga neta a pH neutro, sin embargo, son diferentes en términos de capacidad de establecer puentes de hidrógeno (Boggs *et al.*, 1980, 1986). La fosfatidilserina presenta puentes de hidrógeno a nivel de la cabeza polar que no están presentes en el fosfatidilglicerol (PG). La fosfatidilserina (PS) posee dos grupos cargados negativamente y otro positivamente. Un grupo con carga negativa podría establecer interacciones electrostáticas con grupos catiónicos de la proteína, mientras que el otro podría participar en el establecimiento de puentes de hidrógeno con otras moléculas de fosfolípido. De hecho, se ha afirmado que el grupo fosfato está implicado en la formación de puentes de hidrógeno con el grupo amino de otras moléculas de fosfolípidos (Boggs *et al.*, 1986), aunque esto no ha sido puesto de manifiesto inequívocamente pues el grupo carboxilo también puede participar en la red de puentes de hidrógeno. La carga neta negativa de las moléculas de PS determina la existencia de repulsión electrostática entre ellas, lo cual tiene como consecuencia un debilitamiento de la red de puentes de hidrógeno intermoleculares (Cevc *et al.*, 1981; Koshy y Boggs, 1983; Boggs *et al.*, 1984). La neutralización de las cargas negativas de la PS debido a la interacción con grupos básicos de la  $\alpha$ -sarcina puede tener como consecuencia un debilitamiento o un reforzamiento de dicha red de puentes de hidrógeno. La consideración de estas dos posibilidades implica una diferente interacción con los dos grupos negativos de la cabeza polar de la PS. Esto se ha sugerido como explicación de la interacción entre la gentamicina y la PS, donde el polication parece interaccionar preferentemente con el grupo fosfato más que con el carboxilo (Chung *et al.*, 1985). El reforzamiento de los puentes de hidrógeno tras la interacción con  $\alpha$ -sarcina permitiría un mayor empaquetamiento de las moléculas de PS y, posiblemente, una mayor limitación en cuanto a la capacidad de interacción proteína-lípido, lo cual se manifestaría en una

menor afinidad relativa. Asimismo, la interacción entre la  $\alpha$ -sarcina y PS puede provocar un debilitamiento en la capacidad de formación de puentes de hidrógeno de ésta última, en el caso de que la interacción electrostática se produjese entre grupos catiónicos de la proteína y los grupos de la fosfatidilserina implicados en la formación de dichos puentes de hidrógeno. Sin embargo, este último tipo de interacción no es probable que se produzca debido a que la interacción de la proteína con DMPG, fosfolípido que no puede establecer puentes de hidrógeno interlipídicos, es distinta a la observada con DMPS. Por lo tanto, el reforzamiento de la red de puentes de hidrógeno tras la interacción es, de las dos hipótesis manejadas para explicar la menor afinidad por la DMPS que por DMPG, la hipótesis más plausible. Ahora bien, los puentes de hidrógeno entre diferentes moléculas de fosfolípido puede ocurrir a través de una molécula de agua como puente intermedio (Teissie *et al.*, 1990). Estas moléculas de agua formarían toda una red de puentes de hidrógeno cuya contribución a las interacciones con proteínas no es bien conocida (Slater *et al.*, 1993).

La interacción de diferentes péptidos señal con fosfolípidos ácidos se ha explicado considerando la capacidad de éstos de establecer puentes de hidrógeno. Un análisis estereoquímico revela que la formación del complejo lípido-péptido tiene como consecuencia la neutralización de cargas y, por lo tanto, una disminución de la hidrofilia del mismo (Kajava *et al.*, 1991). Este complejo implica la formación del máximo número de puentes de hidrógeno entre la cabeza polar del fosfolípido y los grupos aceptores/donadores del péptido. Así, los complejos péptido señal-PG o péptido señal-PA son los preferibles para una inserción del péptido en la bicapa lipídica pues contienen el mínimo número de grupos formadores de puentes de hidrógeno libres (Kajava *et al.*, 1991). Esta minimización ha de producirse pues las cadenas de acilo de los fosfolípidos no pueden participar en la formación de este tipo de enlace. Los puentes de hidrógeno han de saturarse, por lo tanto, intermolecularmente, entre la proteína y moléculas de fosfolípido, o intramolecularmente, induciéndose la formación de estructuras ordenadas en la proteína (Kennedy, 1978). Se ha determinado asimismo, que la actividad de translocación de proteínas en vesículas derivadas de membranas de una cepa de *E. coli* deficiente en la síntesis de PG era considerablemente menor que la mostrada por la cepa silvestre (De Vrije *et al.*, 1988). La actividad de translocación se restauró por la incorporación de este fosfolípido gracias a la actividad de proteínas transferidoras de lípidos (Kusters *et al.*, 1989).

Cuando se compara la extensión de la agregación y de la mezcla de lípidos, con la unión de  $\alpha$ -sarcina a las vesículas se puede observar un aspecto interesante. Los resultados de las figuras 3 y 8 se pueden analizar tras su respectiva normalización, por lo

que los tres procesos pueden compararse para cada relación molar proteína/lípido (figura 9). Así, la mezcla de lípidos se satura a una relación molar proteína/lípido que constituye sólo un 20% de la unión total que puede llegar a producirse. La máxima agregación se produce aproximadamente cuando la unión ha alcanzado un 50%. Estas observaciones sugieren la existencia de al menos dos tipos diferentes de unión, los cuales podrían estar relacionados con la diferente interacción en términos de puentes de hidrógeno. Uno de estos tipos de sitios se saturaría a una relación molar baja proteína/lípido (1:150) y estaría directamente implicado en la inducción de mezcla de lípidos (o desestabilización de membrana). El otro tipo de sitios, de menor afinidad, sería responsable de la unión de la mayor parte de la proteína. La mezcla de lípidos promovida por la  $\alpha$ -sarcina entre vesículas de DMPC se satura a un porcentaje de unión similar al observado con vesículas de DMPS; sin embargo, el máximo de agregación y unión se produce a relaciones proteína/lípido menores que las determinadas para DMPS. Esto último también estaría de acuerdo con la existencia de dos tipos de sitios de unión. En el caso de la unión a vesículas de DMPS la neutralización de cargas debido a la saturación de los sitios de unión de mayor afinidad tendría como consecuencia una potenciación en la formación de puentes de hidrógeno, lo cual tendría, a su vez, la consecuencia de una disminución en la afinidad de los restantes sitios de unión. En este sentido, se ha observado que la unión de una proteína a una bicapa puede mostrar un comportamiento aparentemente antiooperativo, ya que la densidad de cargas superficiales disminuye a medida que se produce la unión de la proteína a la misma (Devaux y Seigneuret, 1985). Un comportamiento similar al descrito para la  $\alpha$ -sarcina se ha observado en la interacción entre la proteína básica de la mielina y vesículas de PS (Ramsay *et al.*, 1986). En este caso, una de las primeras etapas de la interacción, según se deriva de estudios calorimétricos, está caracterizada por la formación de enlaces relativamente fuertes entre la proteína y la vesícula (Ramsay *et al.*, 1986). La caracterización de este último sistema mediante estudios de difracción de rayos X permite obtener conclusiones similares (Sedzik *et al.*, 1984).

Finalmente, este tipo de interacciones pueden tener algún tipo de relevancia en cuanto a la situación *in vivo*, es decir, en cuanto a las interacciones que ocurren a nivel de la membrana plasmática de las células diana sobre las que actúa la  $\alpha$ -sarcina. En realidad, la membrana plasmática es una estructura de carácter dinámico desde el punto de vista espacial y temporal. La composición lipídica de ésta puede variar como respuesta a variaciones ambientales de modo que la célula puede desarrollar sus funciones fisiológicas en condiciones óptimas. Las diferencias observadas en la interacción entre la  $\alpha$ -sarcina y vesículas de PG y PS pudiera tener significado biológico. Desde este punto de vista, las células tumorales poseen un mayor contenido de PS en la monocapa externa de la membrana plasmática que sus correspondientes células no transformadas (Connor *et*

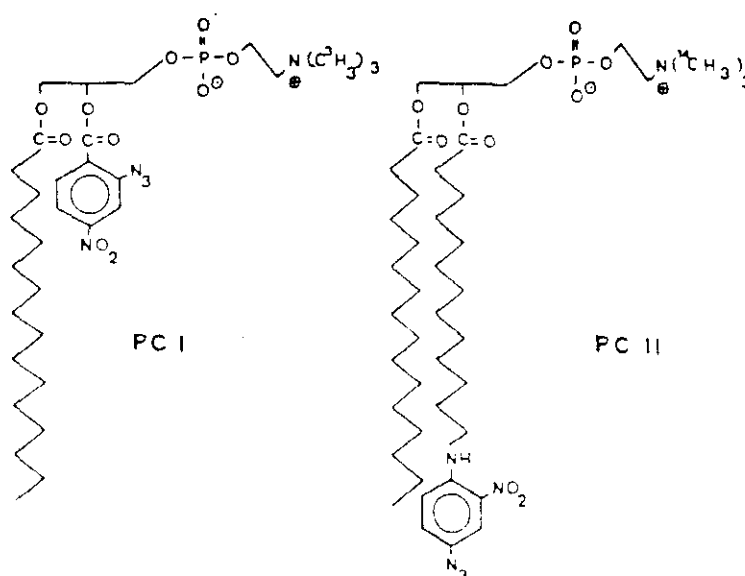
*al.*, 1989; Utsugi *et al.*, 1991; Zachowsky, 1993). Este hecho podría estar relacionado con la actividad antitumoral que demuestra la  $\alpha$ -sarcina y que fue la primera actividad determinada para la proteína (Goldin *et al.*, 1966).



## 2. TRANSLOCACION DE $\alpha$ -SARCINA A TRAVES DE LA BICAPA LIPIDICA DE VESICULAS DE ASOLECTINA

### Fotomarcaje hidrofóbico de la $\alpha$ -sarcina

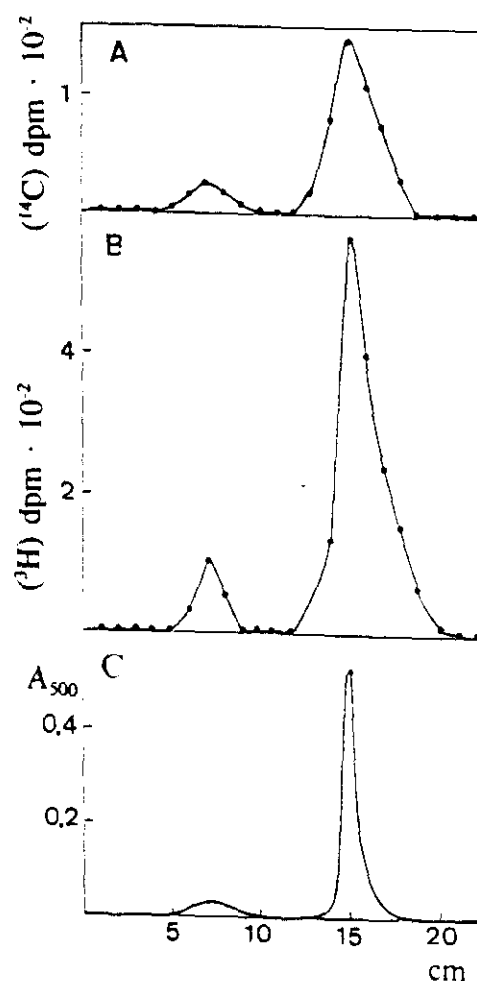
Con la finalidad de estudiar la posible inserción de la  $\alpha$ -sarcina en el interior hidrofóbico de las bicapas de asolectina (PC 24%, PE 39%, PS 19%, PA 6%, PI 1%, lisoderivados 9%, otros fosfolípidos 2%) se llevaron a cabo experimentos de fotomarcaje empleando vesículas que poseen trazas de dos tipos de fosfolípidos fotoactivables (figura 10). Cuando a estos fosfolípidos se los somete a iluminación con luz UV de longitud de onda larga se produce la generación de intermediarios reactivos capaces de marcar moléculas vecinas. PC-I posee el grupo fotoactivable (nitroarilazida) próximo al grupo polar, por lo que tal reactivo serviría de sonda de la región cercana a las cabezas polares de los fosfolípidos. PC-II posee el grupo fotoactivable a nivel del carbono 12 de las cadenas de acilo de los ácidos grasos, por lo que sirve de sonda del núcleo hidrofóbico de la bicapa. La capacidad de tales sondas para discriminar entre regiones de proteínas insertadas en la bicapa, a diferentes niveles, de regiones que no lo están ha sido puesta de manifiesto anteriormente (Bisson y Montecucco, 1985, 1986; Montecucco, 1988).



**Figura 10. Estructura de los fosfolípidos que portan los grupos fotoactivables.** (PC-I) 1-palmitoil-2-(2-azido-4-nitrobenzoyl)-*sn*-glicerol-3-[ $^3\text{H}$ ]-fosfocolina; (PC-II) 1-miristoil-2-{12-[(4-azido-2-nitrofenil) amino] dodecanoil}-*sn*-glicerol-3-[ $^{14}\text{C}$ ]-fosfocolina.

La figura 11 muestra los perfiles de marcaje del componente proteico de complejos proteína-vesícula tras haberlos sometidos a irradiación, tal como aparecen en geles de poliacrilamida-SDS. Se pueden observar dos picos de radiactividad, correspondientes a las fracciones de dímero y monómero de  $\alpha$ -sarcina, tal y como se deduce de la comparación con un gel paralelo teñido con azul de Coomassie (figura 11c). El marcaje radiactivo aparece con las dos sondas empleadas, PC-I y PC-II, lo cual es indicativo de que la interacción de la  $\alpha$ -sarcina con las vesículas no es solamente de carácter superficial, sino que la proteína es capaz de acceder al núcleo hidrofóbico de la bicapa. La relación normalizada  $^{14}\text{C}/^3\text{H}$  resulta ser 4.5, lo cual indicaría un mayor marcaje con la sonda PC-II que con PC-I. Estos resultados son similares a los obtenidos con vesículas de DMPG, en donde la relación obtenida fue de 3.8 (Gasset *et al.*, 1991a). Asimismo, no se detecta

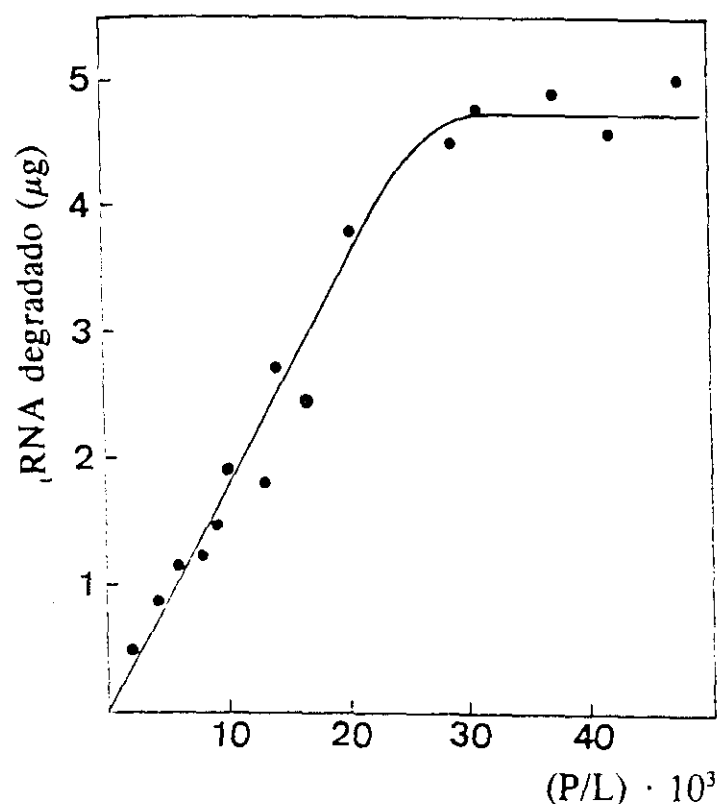
**Figura 11. Fotomarcaje hidrofóbico de  $\alpha$ -sarcina con fosfolípidos fotoactivables.** Las vesículas de asolectina marcadas con PC-I (b) o PC-II (a) se incubaron con  $\alpha$ -sarcina en tampón Mops 50 mM, pH 7.0 con NaCl 0.1 M. Los componentes proteicos de la mezcla de reacción se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Se muestra la distribución de radiactividad de  $^3\text{H}$  (b; sonda PC-I) y de  $^{14}\text{C}$  (a; sonda PC-II) de los geles obtenidos. Los valores de radiactividad son los determinados por cada fragmento de 2 mm de gel. La figura (c) muestra un perfil densitométrico de un gel de SDS-PAGE de una muestra de  $\alpha$ -sarcina tras su tinción con azul de Coomassie. Los picos menores corresponden a la fracción de dímero. La relación molar lípido/proteína empleada en los ensayos de fotomarcaje fue de 300:1.



marcaje cuando las vesículas empleadas están contituidas por PC de huevo, con las que no se ha observado interacción con  $\alpha$ -sarcina, lo cual descarta la existencia de un marcaje inespecífico que pudiera ser debido a la difusión de la sonda activa al medio.

### Degradación de tRNA encapsulado

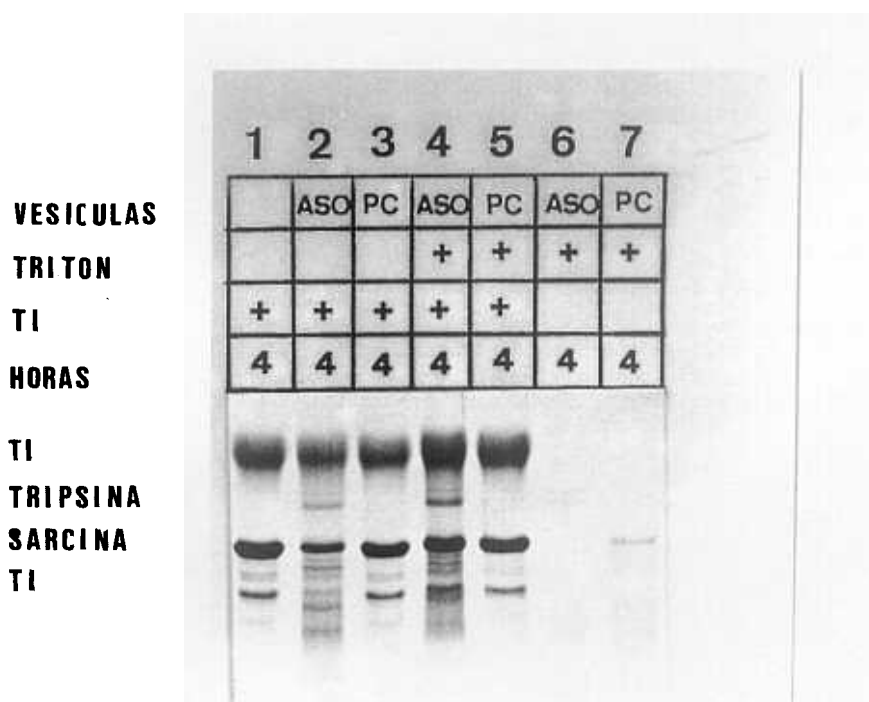
Los ensayos de degradación de tRNA intravesicular por  $\alpha$ -sarcina añadida al medio extravesicular se llevaron a cabo para registrar la posible capacidad de la proteína de acceder al interior de las vesículas en estado nativo. La degradación del tRNA por  $\alpha$ -sarcina en ausencia de vesículas lipídicas origina fragmentos de RNA solubles por ácido perclórico. Controles previos de esta actividad enzimática demuestran una correlación directa entre la absorbancia a 260 nm de los productos solubles por ácido y la degradación por  $\alpha$ -sarcina de tRNA. La adición de  $\alpha$ -sarcina a una disolución de vesículas de asolectina que contienen tRNA en su interior determina la degradación de éste (figura 12).



**Figura 12. Hidrólisis de tRNA encapsulado por  $\alpha$ -sarcina añadida extravesicularmente.** Los análisis se llevaron a cabo en 0.2 ml de tampón Mops 50 mM, pH 7.0 con 0.1 M NaCl. Se emplearon vesículas de asolectina con tRNA encapsulado a una concentración de lípido total de 1 mM. Tras la adición de la correspondiente cantidad de  $\alpha$ -sarcina de una disolución inicial 0.17 mM, la muestra se incubó y se determinó la degradación de tRNA (véase parte experimental). Cada valor representa el promedio de tres medidas independientes.

La cantidad de tRNA degradado es proporcional a la concentración de  $\alpha$ -sarcina añadida al medio extravesicular hasta una relación molar 40:1 (lípid/proteína). Se deduce, por lo tanto, que, o bien la  $\alpha$ -sarcina íntegra, o bien la región responsable de la hidrólisis del tRNA accede al medio intravesicular en estado nativo.

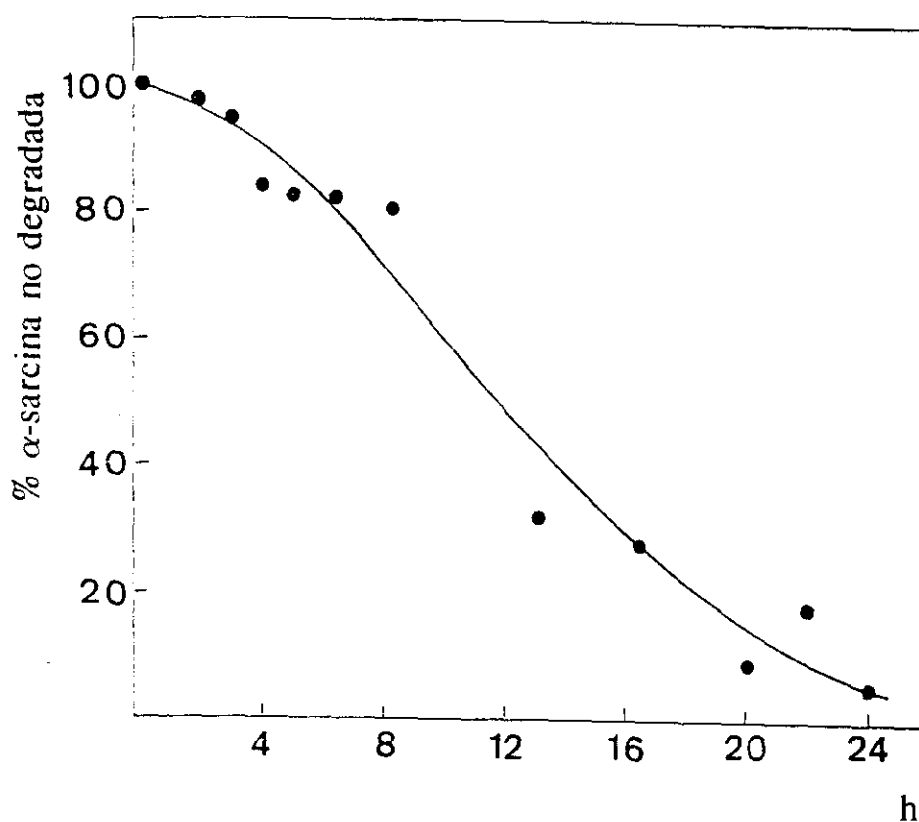
La digestión de tRNA observada podría deberse sin embargo a una liberación al medio extravesicular del material encapsulado, espontánea o inducida por  $\alpha$ -sarcina. En este sentido, los controles llevados a cabo indican por una parte, que no hay tRNA libre tras un lavado exhaustivo de las vesículas, descartándose la posibilidad de liberación espontánea y, por otra, que no hay tRNA libre en el medio tras lavar los complejos  $\alpha$ -sarcina-vesículas. En este último caso, no puede descartarse, sin embargo, la existencia de liberación de tRNA, puesto que en el medio se encuentra  $\alpha$ -sarcina catalíticamente activa.



**Figura 13.** Análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS de la degradación de  $\alpha$ -sarcina por tripsina encapsulada en vesículas lipídicas. Las vesículas empleadas, de PC de huevo (PC; pocillos 3, 5 y 7) y de asolectina (ASO; pocillos 2, 4 y 6), contenían tripsina en su interior. La concentración total de lípido en el ensayo fue de 3.2 mM. La  $\alpha$ -sarcina se añade al medio extravesicular (Mops 50 mM, pH 7.0 con NaCl 0.1 M). La presencia de inhibidor de tripsina (TI; pocillos 1-5) y la de Triton X-100 al 1% (Triton; pocillos 4-7) se indica con el signo (+). Las muestras se analizaron electroforéticamente tras 4 h de incubación.

### Digestión de $\alpha$ -sarcina por tripsina intravesicular

Cuando se incubaba  $\alpha$ -sarcina en presencia de vesículas que contienen tripsina en su interior, así como un exceso de inhibidor de tripsina en el exterior vesicular, se observa que la proteína se digiere (figura 13). Tal como aparece en esta figura, a las 4 horas de incubación ya puede observarse una sustancial degradación de  $\alpha$ -sarcina (figura 13, pocillo 2). La degradación de  $\alpha$ -sarcina, en las condiciones experimentales empleadas, sólo puede deberse a la digestión intravesicular catalizada por tripsina, ya que cualquier traza de proteasa que pudiese haber alcanzado el medio extravesicular estaría totalmente inhibida. Este hecho queda confirmado por los siguientes controles: i) una relación 2:1 en peso inhibidor/tripsina es suficiente para inhibir totalmente a la proteasa presente en el medio



**Figura 14. Cinética de la degradación de  $\alpha$ -sarcina por tripsina encapsulada.** Se incubó  $\alpha$ -sarcina ( $2.9 \mu\text{M}$ ) con vesículas de asolectina que contenían tripsina en su interior, en 0.2 ml de Mops 50 mM, pH 7.0 con NaCl 0.1 M, bajo las condiciones especificadas en la parte experimental. El porcentaje de proteína no degradada para cada tiempo fue evaluado mediante análisis densitométrico de los geles de poliacrilamida correspondientes. Los valores son el promedio de cuatro medidas independientes.

extravesicular (en estos ensayos se emplea una relación 15-20:1); ii) la incubación con  $\alpha$ -sarcina de los sobrenadantes obtenidos de los lavados de las vesículas no induce su degradación triptica; iii) no se observa degradación de  $\alpha$ -sarcina cuando las vesículas se lisan con Triton X-100 (figura 13, pocillo 4), lo cual significa que la tripsina encapsulada sería inhibida totalmente si estuviera en el medio extravesicular. En ausencia de inhibidor de tripsina la lisis de las vesículas con Triton X-100 determina la digestión total de  $\alpha$ -sarcina (figura 13, pocillo 6). Si estos experimentos se llevan a cabo con vesículas de PC, con las que no interacciona la  $\alpha$ -sarcina (Gasset *et al.*, 1989, 1990), no se observa degradación intravesicular (figura 13, pocillo 3; controles en los pocillos 5 y 7). El volumen encapsulado por vesículas de PC de huevo es, sin embargo, menor que el de las vesículas de asolectina (Hope *et al.*, 1985), con lo que la menor cantidad de tripsina encapsulada podría explicar el hecho de no observarse una degradación total de  $\alpha$ -sarcina cuando las vesículas son lisadas con Triton X-100 y en el medio no está presente el inhibidor de tripsina (figura 13, pocillo 7). Este resultado descarta a su vez cualquier posibilidad relativa a la adsorción inespecífica de tripsina en la superficie de las vesículas lipídicas. Asimismo, se requieren aproximadamente 24 horas de incubación para observarse una degradación triptica total de  $\alpha$ -sarcina a una relación en peso de 50:1 ( $\alpha$ -sarcina/tripsina) en ausencia de vesículas, aun cuando el contenido en lisina más arginina de esta proteína es relativamente alto (15% del contenido total de aminoácidos). Por otra parte, otra serie de experimentos de digestiones tripticas de  $\alpha$ -sarcina demuestran que las vesículas la protegen frente a la proteólisis extravesicular. De hecho en estas últimas condiciones no se observa degradación total de  $\alpha$ -sarcina (Oñaderra *et al.*, 1989).

En la figura 14 aparece la dependencia con el tiempo de la digestión de  $\alpha$ -sarcina por tripsina encapsulada. A las 24 h prácticamente toda la proteína ha sido digerida. Un análisis de este proceso mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS aparece en la figura 15. La intensidad de la banda correspondiente a la  $\alpha$ -sarcina disminuye con el tiempo, lo cual reafirma la accesibilidad de la proteína a la tripsina intravesicular.

## DISCUSION

La  $\alpha$ -sarcina se clasifica como una proteína inactivante de ribosomas de tipo I (RIP I) (D'Alessio *et al.*, 1991). Estas proteínas están constituidas por una sola cadena polipeptídica, que en numerosos casos se encuentra glicosilada (Lord *et al.*, 1991). Las RIPs de tipo II sin embargo están compuestas por dos cadenas polipeptídicas, una de las cuales posee la capacidad de unión a un receptor de membrana (Lord *et al.*, 1994). Ambos

tipos de proteínas tienen la capacidad de modificar específica e irreversiblemente los ribosomas, lo cual tiene como consecuencia la inactivación de los mismos. Sin embargo, para poder llevar a cabo tal acción catalítica han de pasar necesariamente al interior celular, lo cual ha de implicar una interacción con membranas en alguna fase del proceso de internación (Hausman y Burns, 1992). En general, se piensa que las citotoxinas pueden penetrar al interior celular mediante dos mecanismos: endocitosis o paso directo a través de la membrana plasmática. En este sentido se ha observado que la citotoxicidad de algunas RIP de tipo I de plantas está relacionada con la actividad pinocítica de las células sobre las que actúan; así, la acción citotóxica de éstas es elevada frente a macrófagos (Barbieri y Stirpe, 1982) y trofoblastos (Yeung *et al.*, 1988), células que se caracterizan por su gran actividad de pinocitosis. Asimismo, la  $\alpha$ -sarcina resulta citotóxica para numerosas líneas celulares tumorales humanas, aun en ausencia de agentes permeabilizan-

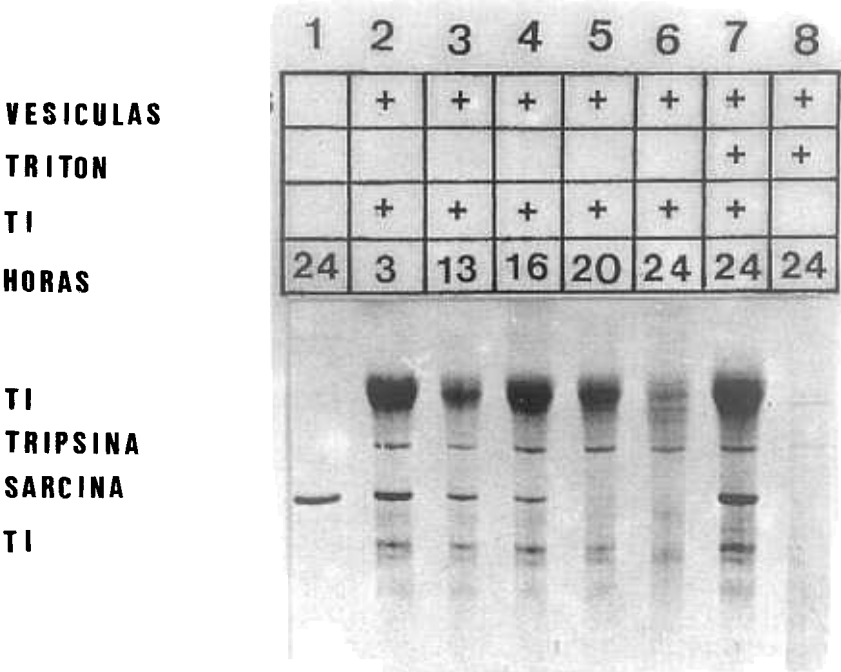


Figura 15. Análisis electroforético de la cinética de degradación de  $\alpha$ -sarcina por tripsina encapsulada. Se añadió  $\alpha$ -sarcina (0.6 nmoles) a una disolución de vesículas de asolectina conteniendo tripsina a una relación molar final lípido/ $\alpha$ -sarcina (260:1), siendo el volumen final 0.2 ml de Mops 50 mM, pH 7.0, con NaCl 0.1 M. Cuando se emplea inhibidor de tripsina (pocillos 2-7) su concentración es 13.6  $\mu$ M. Triton X-100 al 1% final se emplea en los pocillos 7 y 8. Los tiempos de digestión están indicados en cada pocillo.

tes, siendo la causa de la citotoxicidad la inhibición de la síntesis de proteínas (Turnay *et al.*, 1993). En cualquier caso, la citotoxicidad de las RIPs de tipo I es menor que las de tipo II debido a la ausencia en las primeras de una cadena polipeptídica especializada en la unión a un receptor de membrana (Stirpe *et al.*, 1992). En este sentido, se ha demostrado que la  $\alpha$ -sarcina tiene la capacidad de interaccionar con vesículas de fosfolípidos (Gasset *et al.*, 1989, 1991a), produciéndose cambios conformacionales en la proteína (Gasset *et al.*, 1991b), que se han explicado en términos de una combinación de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Tales interacciones se han sugerido como implicadas en el proceso de translocación de la proteína a través de la membrana celular. En este sentido, se ha propuesto que las proteínas translocadas en sistemas celulares deben pasar a través de la membrana por un entorno hidrofílico de naturaleza proteica (Gorlich *et al.*, 1992; Vestweber *et al.*, 1989). Sin embargo, el papel exacto que juegan los lípidos en la translocación de proteínas no se conoce, llegando a proponerse procesos de translocación a través de la bicapa lipídica sin el auxilio de proteínas catalizadoras (von Heijne y Blomberg, 1979; Wickner, 1979; Engelman y Steitz, 1981).

Los experimentos mostrados aquí pretenden demostrar la capacidad de la  $\alpha$ -sarcina de translocarse a través de la membrana plasmática de vesículas modelo de asolectina, lo cual sería una prueba directa de la capacidad intrínseca de la proteína para actuar sobre membranas y, como consecuencia de ello, translocarse a su través. Los ensayos de fotomarcaje aportan información sobre la inserción de proteínas en membranas siempre que los reactivos fotoactivables discriminen inequívocamente entre las regiones de la proteína insertadas de las que no lo están (Harter *et al.*, 1988). En este sentido, se ha comprobado que las sondas empleadas en estos experimentos son adecuadas para ello (Bisson y Montecucco, 1985, 1986; Papini *et al.*, 1987; Montecucco, 1988). Los resultados obtenidos con el sistema  $\alpha$ -sarcina - vesículas de asolectina, son una evidencia experimental de la inserción de la proteína en la bicapa. Esta inserción no sólo se limitaría a la región de la cabeza polar de los fosfolípidos (marcaje positivo con PC-I) sino que se extendería a la región de las cadenas de acilo de los mismos (marcaje positivo con PC-II). Además, la  $\alpha$ -sarcina es capaz de digerir tRNA encapsulado en las vesículas, así como de ser digerida por tripsina encapsulada. Estas dos series de ensayos aportan sólidas evidencias del paso de la proteína al interior vesicular.

En la primera serie de ensayos, la translocación se ha registrado empleando la actividad ribonucleolítica de la  $\alpha$ -sarcina como marcador. El tRNA encapsulado en el interior vesicular es accesible a la proteína añadida al medio extravesicular si ésta consigue penetrar al interior en estado enzimáticamente activo. Sin embargo, la observación de digestión de tRNA no es una prueba inequívoca de entrada al interior vesicular pues en



este caso, existe la posibilidad de liberación de esta molécula al medio tras la interacción de la  $\alpha$ -sarcina con las vesículas. En nuestras condiciones experimentales esta posibilidad no puede resolverse pues no se ha inhibido la actividad ribonucleasa extravesicular.

En la segunda serie de experimentos se ha empleado la actividad triptica intravesicular como indicador de translocación. En este caso, la  $\alpha$ -sarcina añadida extravesicularmente es accesible a la tripsina intravesicular si la toxina es capaz de pasar a través de la bicapa lipídica. Las condiciones experimentales en esta segunda serie de ensayos permiten descartar toda posibilidad de digestión triptica extravesicular, por lo que la digestión de  $\alpha$ -sarcina significaría inequívocamente que ésta ha pasado a través de la membrana. En la escala de tiempo en la que se desarrollan los ensayos, la inhibición de la tripsina que pudiera encontrarse extravesicularmente es tal que aun liberándose toda la tripsina encapsulada desde el comienzo de la incubación con  $\alpha$ -sarcina ésta no se digeriría.

La capacidad de la  $\alpha$ -sarcina de acceder al interior vesicular depende de la naturaleza del lípido empleado, de hecho, la  $\alpha$ -sarcina no es digerida por tripsina encapsulada en vesículas de PC de huevo ni resulta marcada por sondas incorporadas en tales vesículas (Gasset *et al.*, 1991a), todo lo cual está de acuerdo con la ausencia de interacción entre  $\alpha$ -sarcina y vesículas neutras (Gasset *et al.*, 1989). Un requerimiento de lípido similar se ha determinado para la translocación del apocitocromo c en sistemas modelo (Rietveld *et al.*, 1986). Asimismo, los requerimientos en cuanto al componente lipídico de diferentes toxinas para translocarse en condiciones óptimas son variados (Sandvig y Olsnes, 1980; Tomasi y Montecucco, 1981).

### 3. PREDICCION DE LA CONFORMACION DE LA PROTEINA $\alpha$ -SARCINA: MODELO ESTRUCTURAL PARA EXPLICAR LA INTERACCION $\alpha$ -SARCINA-MEMBRANAS.

La  $\alpha$ -sarcina exhibe un elevado grado de similitud de secuencia con otras proteínas inactivantes de ribosomas de *Aspergillus* (86% de identidad con mitogilina y restrictocina, ambas de *A. restrictus* y 85% con el alergen I (Asp fI) de *A. fumigatus*) (figura 16). Sin embargo, esta similitud estructural es de escasa utilidad para el análisis de la conformación de la  $\alpha$ -sarcina ya que no existen datos de la estructura tridimensional de estas tres proteínas. Pero la  $\alpha$ -sarcina muestra también un alto grado de similitud de secuencia con otras ribonucleasas (RNasas). Hay al menos tres subfamilias de RNasas microbianas de las que la RNasa T1, barnasa y RNasa St son los representantes característicos (Nakamura

	10	20	30	40
SARC	AVTWTCLNDQKNP	KTNYETKRLLYNQ	NKAESNSHHAP	LSDGKTGSSYPH
MITO	ATWTCINQQLNP	KTNWEDKRLLYNQ	AKAESNSHHAP	LSDGKTGSSYPH
FUMI	ATWTCINQQLNP	KTNWEDKRLLYNQ	AKAESNSHHAP	LSDGKTGSSYPH
	**** *	***** *	***** *	***** *
	60	70	80	90
SARC	WFTNGYDGDGKLP	KDRTPIKFGKSD	CDRPPKHSKD	GNGKTDHYLLEFPTF
MITO	WFTNGYDGNGLIK	GRTPIKFGKAD	CDRPPKHSQ	NGMGKDDHYLLEFPTF
FUMI	WFTNGYDGNGLIK	GRTPIKFGKAD	CDRPPKHSQ	NGMGKDDHYLLEFPTF
	***** *	***** *	***** *	***** *
	110	120	130	140
SARC	PDGHDYKFDSKKP	KENPGPARVIYT	YPNKVFCGIIA	HTKENQGELKLCSE
MITO	PDGHDYKFDSKKP	KENPGPARVIYT	YPNKVFCGIIA	HQQRGNQGDRLRLCSE
FUMI	PDGHDYKFDSKKP	KEDPGPARVIYT	YPNKVFCGIIA	HQQRGNQGDRLRLCSE
	***** *	***** *	***** *	***** *

**Figura 16.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de  $\alpha$ -sarcina (SARC) (Sacco *et al.*, 1983), mitogilina (MITO) (Fernández-Luna *et al.*, 1985) y alergen Asp fI (FUMI) (Moser *et al.*, 1992). La numeración de las secuencias se establece con respecto a la de la  $\alpha$ -sarcina. Los residuos de aminoácidos conservados en las tres proteínas están marcados con el símbolo (\*). La secuencia de aminoácidos de la restrictocina se diferencia de la correspondiente a la mitogilina en un solo aminoácido: en la restrictocina aparece una serina en la posición 26 (López-Otín *et al.*, 1984), mientras que en la mitogilina es una Asn.

RNAT	ACDYTC	GSNCYSSSDV	STAQAAGYQLHEDGETVGSNSYPH	▲
RNC2	DCDYTC	GSHCYASAV	SDAQSAGYQLQSAGQSVGRSRYPH	
RNMS	ESCEYTC	GSTCYWSSDV	SAAKAKGYSLYESGDTI DDYPH	
RNPB	ACAATC	GTVCYTSSAI	SSAQAAGYNLYSTNDDV SNYPH	
RNF1	ESATTC	GSTNYSASQV	RAAANAACQYYQNDDSDAGSTTYPH	
RNU1	EGGVSVNC	GGTYYSSTQV	NRAINNA KSGQYSSTGYPH	
RNU2	CDIPQSTNC	GGNVYSNDDI	NTAIQALDDVANGDR PDNYPH	
SARC	AVTWTCLNDQKNPKTNKYETKRLLYNQKAESNSHAPLSDGKTGSSYPH			
	o o o o *	o o * o o	o o	o o o o *

RNAT	△ ΔΔΔΔ	FDFS VS	SPY YEWPII	●
RNC2	QY RNYEG	FNFP VS	GNV YEWPII	
RNMS	EY HDYEG	FDFP VS	GTI YEYPII	
RNPB	EY HNYEG	FDFP VS	GTI YEFPII	
RNF1	TY NNYEG	FDFP VD	GPY QEFPII	
RNU1	TY NNYEG	FDFS DY CD	GPY KEYPLK	
RNU2	QY YDEAS	DQITLC CG	PGSW SEFPLV	
SARC	WFTNGYDGDGKLPKGRTPIKFGKSDCDRFPKHSKDGNGKTDHYLLEFPTF			
	o o o o	o oo	o * o *	

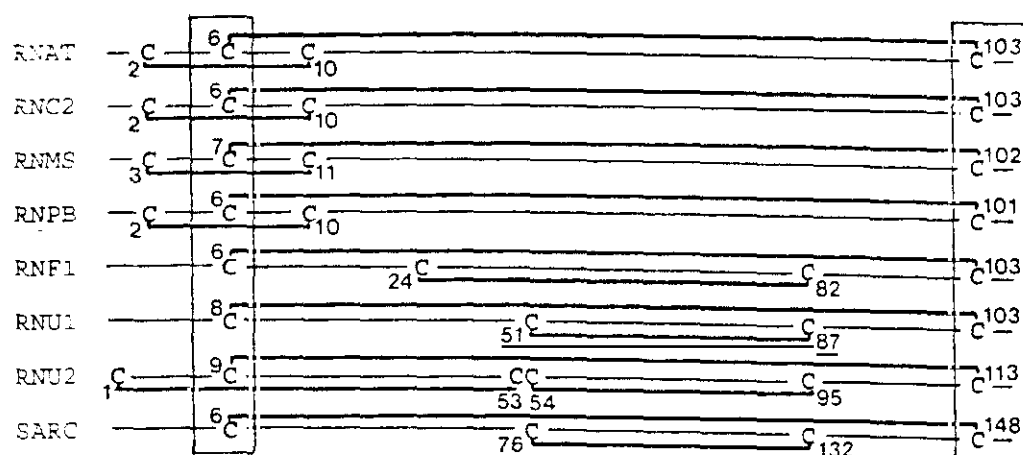
  

RNAT	SSGDVY SG	GSPGADRVVFN ENNQLAGVITHTG	ASGNNFVECT	□
RNC2	SSGSTY NG	GGPGADRVVFN DNDELAGLITHTG	ASGDGFVACY	
RNMS	SDYDVY TG	GSPGADRVIFD GDELAGVITHTG	ASGDDFVACSSS	
RNPB	KSGKVY TG	SSPGADRVIFN DDELAGVITHTG	ASGNNFVACT	
RNF1	SG GVVY TG	GSPGADRVIN TNCEYAGAITHTG	ASGNNFVACSGTN	
RNU1	TSSSGY TG	GSPGADRVVYDSNDGTFCAITHTG	ASGNNFVQCSY	
RNU2	YNGPYY	SSRDNYVSPGPDRVIYQINTGEFCATVTHTG	GAASYDGFTQCS	
SARC	PDGHDYKFDKPKPKENPGPARVIYTPNKVFCGIIATK	ENQELKLCSE		
	oo *	** **oo	o ooooo **	o *o

**Figura 17. Alineamiento múltiple de secuencias de diferentes ribonucleasas fúngicas.** Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de  $\alpha$ -sarcina (Sacco *et al.*, 1983) (SARC), RNasa T1 de *Aspergillus oryzae* (Takahashi, 1985) (RNAT), RNasa C2 de *Aspergillus clavatus* (Bezborodova *et al.*, 1983) (RNC2), RNasa F1 de *Fusarium moniliforme* (Hirabayashi y Yoshida, 1983) (RNF1), RNasa Ms de *Aspergillus saltoi* (Watanabe *et al.*, 1982) (RNMS), RNasa Pb1 de *Penicillium bevicompactum* (Shlyapnikov *et al.*, 1984) (RNPB), RNasa U1 (Takahashi y Hashimoto, 1988) (RNU1) y RNasa U2 (Kanaya y Uchida, 1986) (RNU2), ambas de *Ustilago spherogena*. Los residuos conservados en las 8 proteínas aparecen marcados con el símbolo (\*). Los residuos de la  $\alpha$ -sarcina conservados o que representan sustituciones conservativas en al menos otras 2 proteínas aparecen marcados como (O). Se han considerado las siguientes equivalencias: Trp = Tyr = Phe; Ala = Gly; Ser = Thr; Val = Ile; Asn = Gln = Asp = Glu; Arg = Lys. (●) residuos que participan en la catálisis; (▲) residuos que interaccionan con la molécula de fosfato; (Δ) residuos que interaccionan con la base del nucleótido; (□) residuos que interaccionan con la molécula de ribosa. La funcionalidad de los residuos es de la RNasa T1.

*et al.*, 1982). La  $\alpha$ -sarcina muestra un significativo grado de similitud con las subfamilias representadas por la barnasa y la RNasa St, aunque este grado es menor que el que presenta con las proteínas de la subfamilia de la RNasa T1.

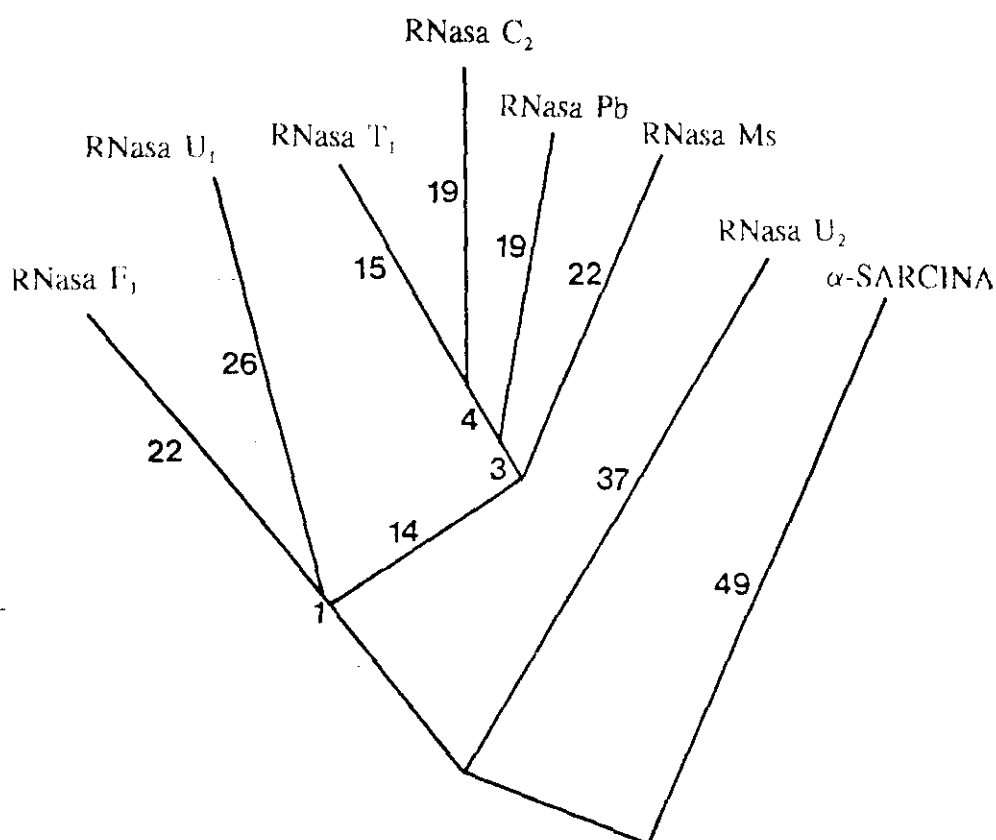
En la figura 17 aparece un alineamiento múltiple de la secuencia de la  $\alpha$ -sarcina y las secuencias de todas las RNasas de la subfamilia de la RNasa T1 conocidas hasta el momento. De acuerdo con este alineamiento hay 15 posiciones idénticas en las 8 proteínas consideradas. Teniendo en cuenta las equivalencias de carácter conservativo indicadas en la figura 17, la  $\alpha$ -sarcina poseería hasta 50 residuos de aminoácidos conservados en tres o más secuencias. Asimismo de los datos de la figura 17 se puede afirmar también que sólo 7 residuos conservados en las proteínas de la subfamilia de la RNasa T1 sufren cambios no conservativos en la  $\alpha$ -sarcina: Gly por Lys-14; Ala por Lys-29; Asp por Ala-120; Thr por Ala-136; Gly por Lys-139; Ala por Glu-140 y Phe por Leu-145 (para la numeración se toma como referencia la secuencia de la  $\alpha$ -sarcina). Estos cambios suponen un aumento neto de la carga positiva de la  $\alpha$ -sarcina con respecto al resto de las proteínas consideradas. La similitud de secuencia de aminoácidos entre la  $\alpha$ -sarcina y el resto de las ribonucleasas fúngicas se extiende a prácticamente la mitad de la molécula de las RNasas ya que la  $\alpha$ -sarcina contiene aproximadamente 40 residuos más que las otras siete pro-



**Figura 18.** Distribución de los puentes disulfuro de las RNasas de la figura 17. Patrones de puentes disulfuro de las 8 proteínas consideradas. Los residuos de cisteína se alinean de acuerdo a los resultados de figura 17.

teínas. Tal similitud comprende a los residuos localizados en el centro activo de la RNasa T1 (figura 17). Es importante resaltar que el Asp-15 de la RNasa T1, implicado en la coordinación de un átomo de calcio estaría sustituido por Arg-22 en la  $\alpha$ -sarcina. El carácter no conservativo de esta sustitución descartaría la capacidad de unión de este ion por la  $\alpha$ -sarcina. A este respecto, se ha verificado que la  $\alpha$ -sarcina no une tales iones (Martínez del Pozo *et al.*, 1989).

Los puentes disulfuro se constituyen como importantes restricciones conformacionales en las proteínas. Las ocho proteínas consideradas poseen dos puentes disulfuro, excepto la RNasa U2, que posee tres. De acuerdo con el alineamiento las cisteínas implicadas en estos puentes disulfuro se localizarían en posiciones homólogas (figura 17). En la figura



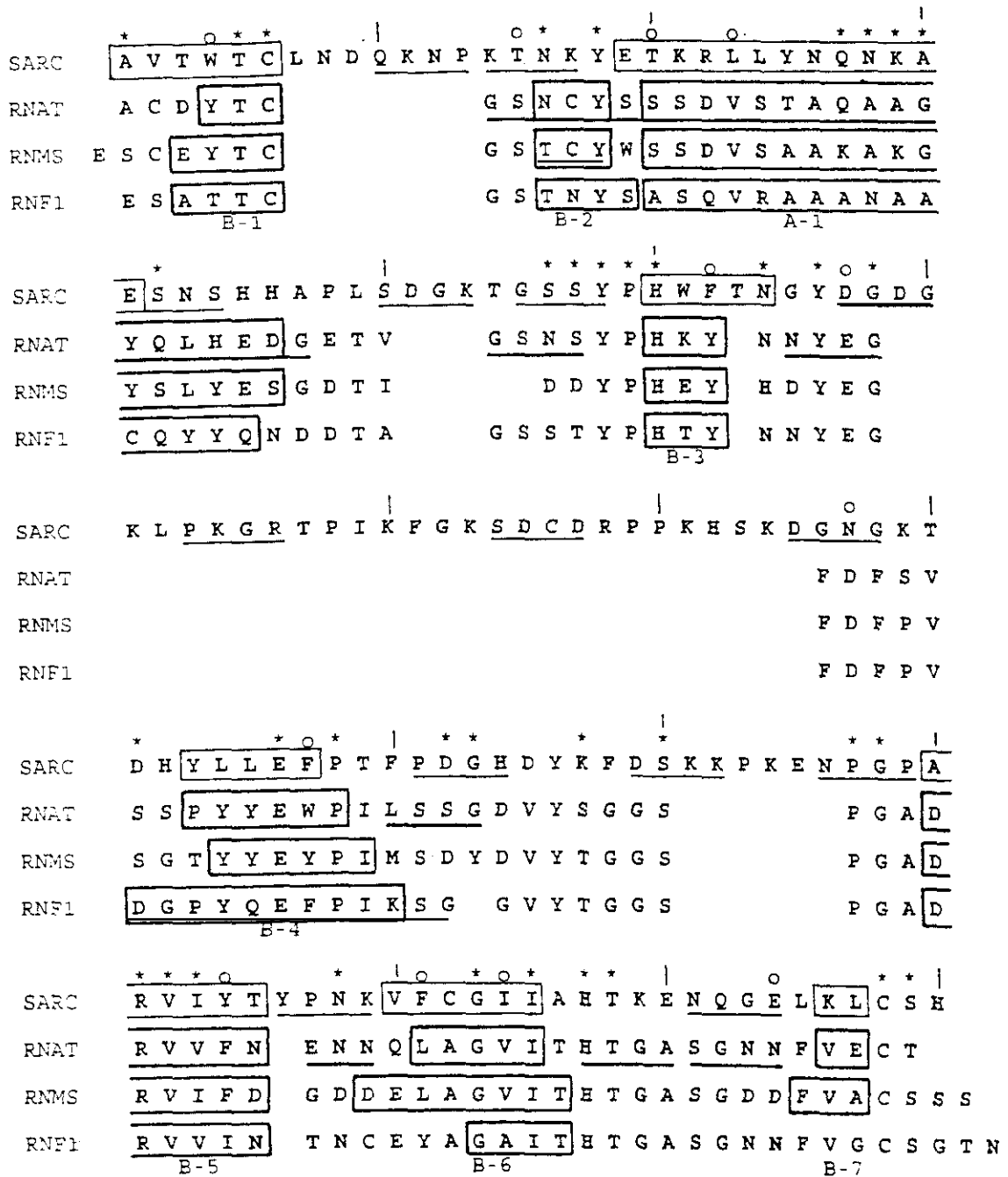
**Figura 19.** Árbol filogenético de las ribonucleasas fúngicas construido a partir de de la matriz de distancia calculada con el programa ALIGN (Doolittle y Feng, 1990). El porcentaje de desviación estándar es 5.89. La distancia se expresa en unidades relativas.

18 aparece un resumen del patrón de puentes disulfuro de las secuencias consideradas. Las ocho proteínas exhiben un puente disulfuro que acerca en el espacio a los extremos amino y carboxilo terminal. El segundo puente disulfuro de la  $\alpha$ -sarcina sería equivalente al presente en la RNasa U1 y U2 (figura 18).

El árbol filogenético calculado a partir de la comparación de secuencias aparece en la figura 19. Aunque la  $\alpha$ -sarcina aparece distante con respecto de la mayoría de las proteínas debido a que presenta unos 40 aminoácidos más, todas las proteínas están relacionadas.

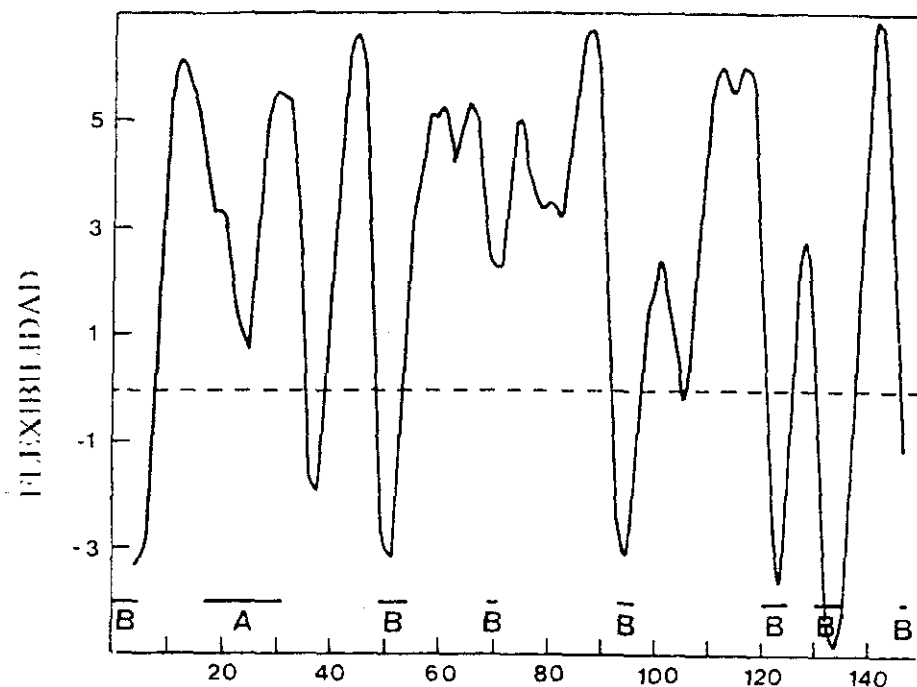
Tres proteínas de la subfamilia de la RNasa T1, la RNasa T1, la RNasa F1 y la RNasa Ms, están caracterizadas en términos de su estructura cristalina. Por lo tanto, pueden ser útiles a la hora de predecir la conformación de la  $\alpha$ -sarcina. La estructura tridimensional de la RNasa T1 (Pace *et al.*, 1991) es la mejor caracterizada de todas ellas; asimismo, recientemente se han determinado las de la RNasa Ms y la de la RNasa F1 (Nonaka *et al.*, 1993; Vassylyev *et al.*, 1993), encontrándose que todas ellas son muy similares. Un alineamiento de las estructuras de estas ribonucleasas considerando las coordenadas espaciales de sus  $C_{\alpha}$  revela que las estructuras son coincidentes en una extensión del 90% (los rms son menores de 0.75 Å) (figura 20). De acuerdo con la similitud observada entre la  $\alpha$ -sarcina y este grupo de proteínas, el siguiente estudio de predicción para la estructura de la  $\alpha$ -sarcina se basa en la estructura de estas ribonucleasas. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la  $\alpha$ -sarcina se ha llevado a cabo considerando las regiones que contienen elementos de estructura secundaria comunes a las estructuras de las ribonucleasas (figura 20). Posteriormente se ha llevado a cabo la predicción de estructura secundaria.

En la  $\alpha$ -sarcina se predice la presencia de 15 giros  $\beta$ . Con la finalidad de asignar dichos giros en la proteína se consideran los siguientes criterios: los giros  $\beta$  predichos que serían homólogos a los presentes en la estructura tridimensional de la RNasa T1 se aceptan (6 en total); los giros  $\beta$  predichos en la estructura de la  $\alpha$ -sarcina en regiones no homólogas a regiones de la RNasa T1 también se aceptan (6 en total); se descartan los giros  $\beta$  homólogos a los predichos en la RNasa T1 pero que no aparecen como tales en la estructura tridimensional de la misma (1 del total). Estas consideraciones dan cuenta, por lo tanto, de 13 de los 15 giros predichos. En cuanto a los otros 2 giros  $\beta$ , se tiene que tener en cuenta que en la RNasa T1 se predicen 10 giros  $\beta$  de los cuales sólo 8 aparecen realmente en la estructura cristalina de la proteína libre (Pace *et al.*, 1991), apareciendo uno más (en las posiciones 1-5) cuando la proteína se encuentra formando un complejo con 2'AMP o 2'GMP (Hakoshima *et al.*, 1992). El otro giro  $\beta$  sobrepredicho en la RNasa T1



**Figura 20. Resumen de las estructuras secundarias de: RNAT, RNMS y RNF1 deducido de las correspondientes estructuras cristalinas (Pace *et al.*, 1991; Nonaka *et al.*, 1993 y Vassilyev *et al.*, 1993, respectivamente).  $\alpha$ -Hélice (A-1) y cadenas  $\beta$  (B-1 a B-7) se encuentran en cajas; los giros  $\beta$  de la RNAT aparecen marcados por barras horizontales. El alineamiento de las secuencias se ha llevado a cabo de acuerdo con las coordenadas de los C $\alpha$  empleando el software InsightII de Biosym. La secuencia de aminoácidos de la  $\alpha$ -sarcina se ha alineado con éstas considerando las correspondientes coordenadas de las estructuras cristalinas de estas tres RNasas empleando el software InsightII de Biosym. Los elementos de estructura secundaria aparecen marcados como en la figura 20. (\*) Residuos de  $\alpha$ -sarcina que aparecen en al menos una de las otras RNasas; (○) sustituciones conservativas.**

se encuentra en las posiciones 54-57. Además, el método de predicción no encuentra un giro  $\beta$  que sí aparece en la estructura cristalina y que se sitúa en las posición 27-30; este giro contiene, sin embargo, los últimos tres residuos de la única  $\alpha$ -hélice de la molécula, siendo ésta probablemente la razón de la inexactitud de la predicción. Tras todas estas consideraciones sólo un giro de la RNasa T1 (posiciones 92-95) no aparece predicho en la  $\alpha$ -sarcina, mientras que son 2 los giros  $\beta$  predichos en la  $\alpha$ -sarcina que no aparecen en la RNasa T1 (posiciones 31-34 y 116-119 en la  $\alpha$ -sarcina), aunque uno de éstos podría ser equivalente al no predicho en la RNasa T1 que se localiza en el extremo de la  $\alpha$ -hélice. De acuerdo con todo ello, la  $\alpha$ -sarcina contendría 14 giros  $\beta$  (figura 20). Finalmente, es importante resaltar el hecho de que algunos de los giros  $\beta$  predichos en la  $\alpha$ -sarcina están localizados en posiciones equivalentes a los presentes en la estructura cristalina de la RNasa T1, aunque tales regiones no exhiben un alto grado de similitud de secuencia.



**Figura 21. Perfil de flexibilidad derivado de la secuencia de la  $\alpha$ -sarcina basado en (Karplus y Schulz, 1986).** Los datos se expresan en unidades arbitrarias. Las regiones predichas en  $\alpha$ -hélice (A) y en estructura  $\beta$  (B) se indican también. Se ha empleado una ventana de 7 residuos.



Con la misma metodología se han predicho las regiones de  $\alpha$ -hélice y de estructura  $\beta$ . Los resultados obtenidos aparecen en la figura 20, en comparación con las estructuras secundarias de la RNasa T1, RNasa Ms y RNasa F1, según se derivan de sus correspondientes estructuras cristalinas. De este modo, partiendo de la secuencia de la  $\alpha$ -sarcina, se predicen 7 hebras  $\beta$ , 6 de las cuales corresponden a regiones  $\beta$  equivalentes en la RNasa T1 (esta proteína contiene 7 hebras  $\beta$ ), apareciendo la restante en una región extra de la  $\alpha$ -sarcina (posiciones 69-71). La hebra  $\beta$  de la RNasa T1 localizada al comienzo de la  $\alpha$ -hélice no aparece predicha en la  $\alpha$ -sarcina. Es importante considerar las dos hebras  $\beta$  de la  $\alpha$ -sarcina que aparecen en las posiciones 120-125 y 130-135. Ambas son equivalentes a las que aparecen en las posiciones 76-81 y 86-90 de la RNasa T1, que son precisamente las que constituyen la parte central del núcleo en  $\beta$  de esta proteína. Finalmente, la molécula de  $\alpha$ -sarcina contendría una  $\alpha$ -hélice en una posición equivalente a la de la RNasa T1.

De acuerdo con este estudio de predicción la  $\alpha$ -sarcina tendría un 10% de contenido en  $\alpha$ -hélice y un 22% de estructura  $\beta$ . A este respecto, los porcentajes de  $\alpha$ -hélice obtenidos mediante estudios de dicroísmo circular y de espectroscopía de infrarrojo son 20% y 22%, respectivamente (Gasset *et al.*, 1991b). Estos valores son mayores que el predicho mediante este método de predicción. En este sentido, la región en  $\alpha$ -hélice de la RNasa T1, determinada a partir de la estructura cristalina, resulta ser comparativamente mayor que la predicha para la  $\alpha$ -sarcina, por lo que la  $\alpha$ -hélice de la  $\alpha$ -sarcina podría ser mayor que la predicha. En cuanto al contenido en estructura  $\beta$ , el valor obtenido mediante estudios de dicroísmo circular (21%) se aproxima razonablemente al derivado de la predicción teórica (22%). Mediante espectroscopía de infrarrojo se obtienen valores de 17% de estructura  $\beta$  y 23% de láminas  $\beta$  de baja frecuencia (Gasset *et al.*, 1991b).

Las regiones extra de la  $\alpha$ -sarcina serían regiones expuestas de la proteína, claramente relacionadas con "loops", en las cuales el único elemento de estructura secundaria regular serían giros  $\beta$ . Previsiblemente, por su carácter superficial, estas regiones no introducirían alteraciones significativas en el plegamiento de la proteína en comparación con la RNasa T1.

De la figura 20 pueden deducirse fácilmente las equivalencias entre los elementos de estructura secundaria presentes en la RNasa T1 y los predichos en la estructura de la  $\alpha$ -sarcina. Asimismo, pueden observarse dos discrepancias significativas, ambas relativas a las dos cadenas  $\beta$  de tres residuos. El segmento B2 en la RNasa T1 no se predice en la  $\alpha$ -sarcina, mientras que sí se predice un segmento  $\beta$  en una región extra de la  $\alpha$ -sarcina (residuos 69-71). Probablemente, la cadena B-2 también esté presente en la  $\alpha$ -sarcina,

según se puede derivar de la similitud de secuencia en esta región. Aún así, la posibilidad de un error en la interpretación, no modificaría la validez del modelo de plegamiento, ya que esta cadena  $\beta$  está implicada en la denominada lámina  $\beta$  "menor" de las ribonucleasas fúngicas (Nonaka *et al.*, 1993).

Finalmente, se ha llevado a cabo el análisis de flexibilidad para la secuencia de la  $\alpha$ -sarcina (figura 21). Aquellos residuos de aminoácidos presentes en la  $\alpha$ -hélice o en las cadenas  $\beta$  predichas, así como los residuos de la  $\alpha$ -sarcina potencialmente implicados en la catálisis, aparecen en mínimos de flexibilidad, tal como ocurre con la RNasa T1 cuando se analizan los datos de difracción de rayos-X (Pace *et al.*, 1991).

## DISCUSION

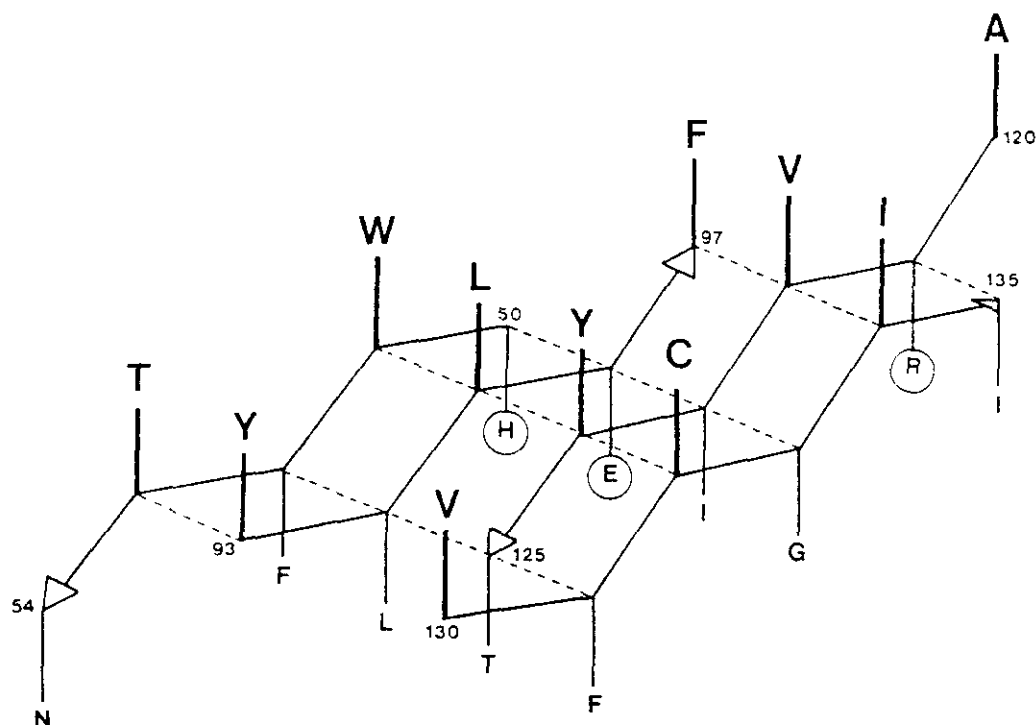
La  $\alpha$ -sarcina interacciona con vesículas compuestas por fosfolípidos ácidos (Gasset *et al.*, 1989; Gasset *et al.*, 1990; Gasset *et al.*, 1991a, 1991b; Oñaderra *et al.*, 1993). A consecuencia de esta interacción se produce la agregación y fusión de tales vesículas. El análisis de estos efectos ha revelado la presencia en la interacción de un componente electrostático y de un componente hidrofóbico. El primero es fácilmente explicable si se considera la naturaleza básica de la  $\alpha$ -sarcina (Sacco *et al.*, 1983), mientras que el segundo no lo es *a priori*, teniendo en cuenta que en la secuencia de la  $\alpha$ -sarcina no aparecen segmentos lo suficientemente hidrofóbicos que puedan dar cuenta de una interacción hidrofóbica con el núcleo de las membranas. Sin embargo, tales interacciones han de ocurrir y, es más, han de explicarse en el contexto del proceso de translocación de proteínas a través de las membranas, puesto que la  $\alpha$ -sarcina es capaz de translocarse, en condiciones en las que dicho proceso depende exclusivamente de la proteína, a través de vesículas modelo de asolectina (Oñaderra *et al.*, 1993). Obviamente, el plegamiento de la cadena polipeptídica de la  $\alpha$ -sarcina debe ser tal que origine la aparición de uno o varios núcleos hidrofóbicos de suficiente envergadura como para estar implicados en tales interacciones hidrofóbicas. El estudio de predicción tiene como finalidad, por lo tanto, el buscar tales núcleos hidrofóbicos originados a consecuencia del plegamiento de la proteína.

La  $\alpha$ -sarcina muestra un significativo grado de similitud de secuencia con varias ribonucleasas fúngicas. Entre los residuos localizados en posiciones homólogas no sólo se encuentran los implicados en el mecanismo catalítico, sino también los residuos de cisteína que forman parte del puente disulfuro que acerca los extremos N y C-terminales de la cadena polipeptídica. Esto podría querer decir que la restricción conformacional impuesta por tal puente disulfuro se mantiene en este grupo de proteínas. Ya ha sido determinada

la estructura cristalina de tres de estas ribonucleasas fúngicas. Las estructuras de la RNasa T1 y la de la RNasa Ms son muy similares (Pace *et al.*, 1991; Nonaka *et al.*, 1993), mientras que la RNasa F1 muestra ligeras diferencias con la de la RNasa T1. Estas diferencias están relacionadas con la organización de los puentes disulfuro y parecen estar limitadas a la región definida por los residuos 81-84 (Vassilyev *et al.*, 1993). Por todo ello, este grupo de ribonucleasas fúngicas puede razonablemente tomarse como modelo para el plegamiento de la cadena polipeptídica de la  $\alpha$ -sarcina. Tomando como base los resultados de los estudios de predicción, la estructura tridimensional de la  $\alpha$ -sarcina podría no ser muy diferente a la de la RNasa T1. Como principales elementos estructurales de la  $\alpha$ -sarcina estarían, al menos, 6 cadenas  $\beta$  y una  $\alpha$ -hélice, los mismos motivos que aparecen en la estructura cristalina de la RNasa T1, aun existiendo diferencias en la secuencia de aminoácidos. Los giros  $\beta$  predichos para la  $\alpha$ -sarcina se pueden relacionar de un modo relativamente directo con los presentes en la RNasa T1. Por lo tanto, se puede proponer que el plegamiento de la cadena polipeptídica de la  $\alpha$ -sarcina es similar al de la RNasa T1. Según los resultados de este estudio, la distancia entre los C $\alpha$  de los residuos de cisteína implicados en el puente disulfuro (Cys-6 Cys-148) de la  $\alpha$ -sarcina sería de 4.5 Å, igualmente a la RNasa T1. La similitud del segundo puente disulfuro de la  $\alpha$ -sarcina es más difícil de analizar puesto que uno de los residuos de cisteína implicados aparece en una región extra de la  $\alpha$ -sarcina (posición 76). La región limitada por este "loop" contiene a la mayoría de los residuos extra de la  $\alpha$ -sarcina, por lo que la modelización resulta más delicada. Aun así, si se considera el alineamiento múltiple de secuencias de la figura 17, los residuos de Cys-76 y Cys-132 de la  $\alpha$ -sarcina, serían equivalentes a los residuos Val-52 y Ala-87 de la RNasa T1; la distancia entre los C $\alpha$  de tales residuos de la RNasa T1 sería de 5.9 Å, distancia que permite la formación de un puente disulfuro.

De acuerdo con este modelo, la estructura de la  $\alpha$ -sarcina estaría compuesta por un núcleo central de cadenas  $\beta$  muy similar al presente en la estructura de la RNasa T1 (la lámina  $\beta$  mayor de las ribonucleasas fúngicas; Nonaka *et al.*, 1993). La principal característica de este núcleo  $\beta$  es la presencia en él de las cuatro hebras  $\beta$  mayores de la RNasa T1 (Pace *et al.*, 1991). Precisamente, estas cuatro cadenas  $\beta$  se encuentran entre las regiones de mayor grado de similitud entre las dos proteínas, lo cual proporciona aún más solidez al modelo propuesto.

La lámina  $\beta$  que correspondería a la  $\alpha$ -sarcina aparece en la figura 22. Esta estructura posee la característica de definir un núcleo hidrofóbico. Ambas superficies de la lámina contienen aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas a excepción del Glu-96 y Arg-121; sin embargo, estos dos residuos, junto con la His-50, son los potencialmente implicados en el mecanismo de catálisis. Por lo tanto, estas superficies son buenos



**Figura 22.** Lámina  $\beta$  antiparalela formada por la cuatro hebras  $\beta$  más conservativas de la  $\alpha$ -sarcina (b, d, e, y f de la figura 20). Los residuos en negrita aparecen a un lado de la lámina  $\beta$ , mientras que el resto lo hacen hacia el otro lado. Los residuos en círculos son los implicados en la catálisis en la RNasa T1. Los números representan la posición en la secuencia. Las flechas indican los extremos C-terminales de cada segmento.

candidatos como participantes en las interacciones hidrofóbicas entre la  $\alpha$ -sarcina y las membranas lipídicas. El plegamiento tridimensional de la  $\alpha$ -sarcina originaría un núcleo hidrofóbico que explicaría las interacciones hidrofóbicas con las vesículas.

Según la similitud de secuencia encontrada entre la  $\alpha$ -sarcina y la RNasa T1, preisamente en el núcleo  $\beta$ , potencialmente responsable de la interacción hidrofóbica con membranas, cabría esperar que esta última proteína interaccionase con vesículas. Esto no se ha observado hasta la fecha; sin embargo, hay que resaltar una diferencia clara entre ambas proteínas: mientras que la RNasa T1 es una proteína ácida, la  $\alpha$ -sarcina es una

proteína básica. Tal y como se ha indicado anteriormente, la diferencia más significativa entre ambas proteínas es la presencia de regiones extra en la  $\alpha$ -sarcina. Estas regiones extra son "loops" que contienen un exceso de carga positiva. Es más, Lys-21, Lys-22, y Lys-29 estaría cercanas entre sí, en la superficie de la  $\alpha$ -hélice predicha para la  $\alpha$ -sarcina, constituyendo una región adicional con exceso de carga positiva (en la RNasa T1 estas cargas positivas no están presentes). Todas estas regiones con densidad de carga positiva elevada podrían participar en las interacciones con lípidos ácidos. La ausencia de dichas cargas en la RNasa T1 explicaría la ausencia de interacción membranas.

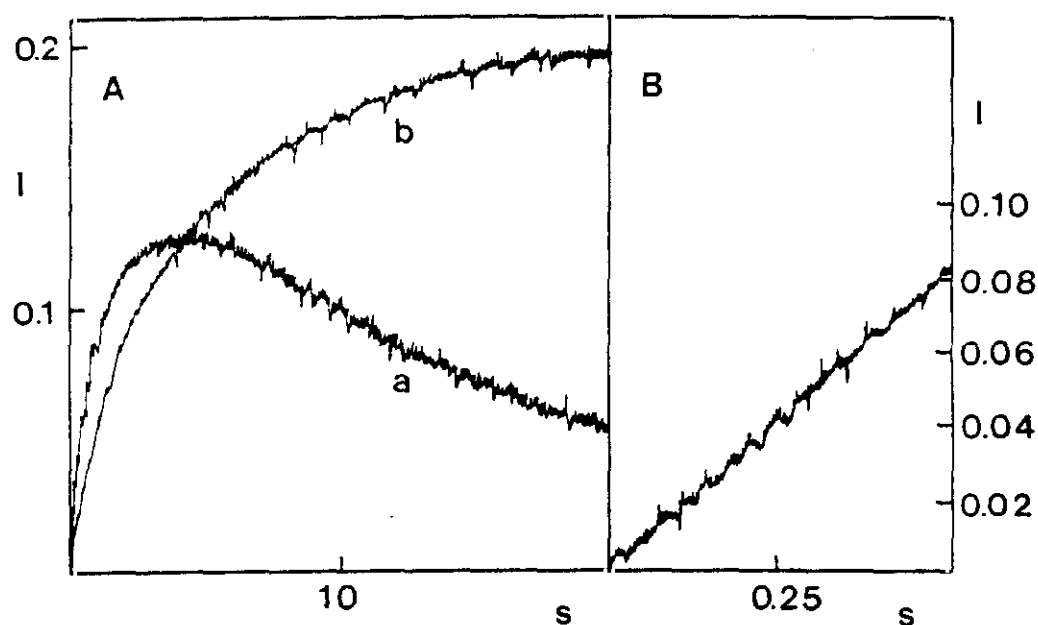
Considerando los resultados de este estudio de predicción, el efecto de la  $\alpha$ -sarcina sobre las membranas podría explicarse del siguiente modo: la proteína, de naturaleza básica, interacciona con fosfolípidos cargados negativamente (etapa de unión); la presencia de cargas positivas en los diferentes loops de la proteína permitiría una interacción simultánea con dos vesículas. El puente entre ellas podría ser mantenido bien por una sola molécula o bien por un agregado de moléculas de proteína (etapa de agregación). Estas dos etapas implican la neutralización de cargas a nivel de la superficie de las vesículas. Esta neutralización modificaría la capa de hidratación de las vesículas. Las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos podrían intercambiarse entre las vesículas agregadas e interaccionar con el núcleo  $\beta$  hidrofóbico de la  $\alpha$ -sarcina (la lámina  $\beta$  mayor de la  $\alpha$ -sarcina). Este proceso sería la desestabilización misma de la bicapa y conduciría a la mezcla de los lípidos de las diferentes vesículas (etapa de mezcla de lípidos). Tras estas etapas se pueden desencadenar numerosos procesos. Las bicapas pueden originar grandes estructuras de fusión, proceso durante el cual algunas moléculas de  $\alpha$ -sarcina podrían quedar atrapadas en su interior, habiéndose producido una translocación efectiva de la proteína. Las defensinas (Fujii *et al.*, 1993) constituyen una familia de péptidos básicos de unos 30 residuos de aminoácidos, con 3 puentes disulfuro y sin homología alguna con la  $\alpha$ -sarcina. Originalmente se aislaron de granulocitos de mamíferos. Estructuralmente se caracterizan por presentar tres cadenas  $\beta$  antiparalelas según se deriva de los datos cristalográficos (Hill *et al.*, 1991). Estos péptidos producen fusión y lisis de vesículas de fosfolípidos mediante un mecanismo (Fujii *et al.*, 1993) muy similar al descrito aquí para la  $\alpha$ -sarcina. Tal modelo está basado en la naturaleza hidrofóbica de las superficies definidas por la lámina  $\beta$  del péptido.

En resumen, la  $\alpha$ -sarcina sería una proteína  $\alpha/\beta$  que a pesar de ser altamente polar, contendría un núcleo hidrofóbico que vendría definido por una lámina  $\beta$ . Este dominio permitiría dar cuenta del componente hidrofóbico de la interacción entre la  $\alpha$ -sarcina y las bicapas necesario para comprender el proceso de translocación de la proteína a través de la membrana, la única forma de explicar la citotoxicidad de la  $\alpha$ -sarcina.

#### 4. ESTUDIO CINETICO DE LA AGREGACION Y MEZCLA DE LIPIDOS DE VESICULAS DE PG Y PS PRODUCIDAS POR $\alpha$ -SARCINA: MEDIDAS DE DISPERSION DE LUZ MEDIANTE TECNICAS DE FLUJO DETENIDO Y MEDIDAS DE TRANSFERENCIA DE ENERGIA DE FLUORESCENCIA

##### Medida de las velocidades iniciales de agregación de vesículas por técnicas de flujo detenido

La adición de  $\alpha$ -sarcina a una dispersión de vesículas de fosfolípidos ácidos produce un aumento en la turbidez de la muestra dependiente del tiempo, debido a la agregación de las vesículas. El análisis de las velocidades iniciales de agregación producida por la proteína se ha llevado a cabo mediante medidas de flujo detenido, debido

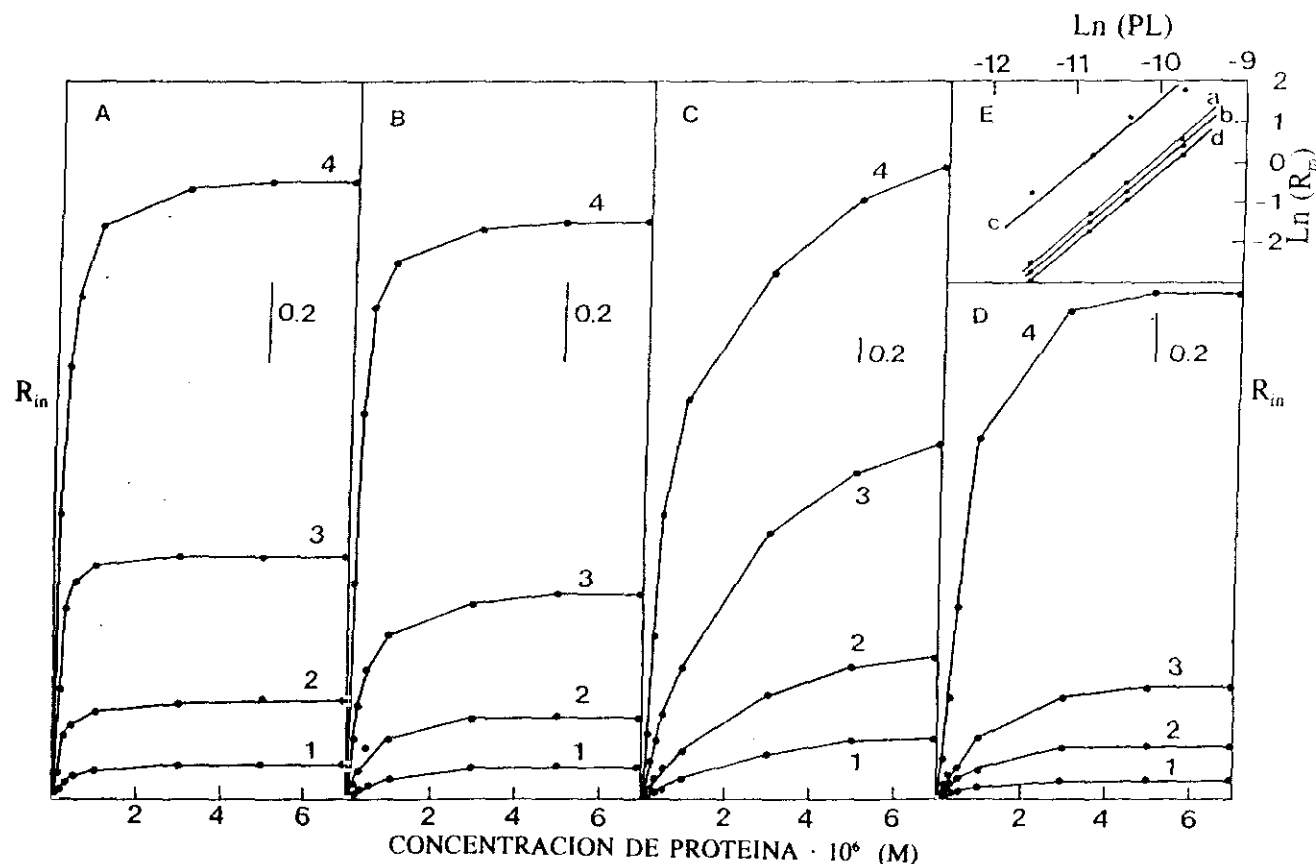


**Figura 23. Medidas de variación de intensidad de luz dispersada a  $90^\circ$  mediante técnicas de flujo detenido tras la adición de  $\alpha$ -sarcina a una disolución de vesículas lipídicas. (A) Variación de intensidad de luz dispersada (V) frente al tiempo (s) tras la adición de  $\alpha$ -sarcina ( $1 \mu\text{M}$  concentración final) a vesículas de PS de cerebro bovino (a), o a vesículas de DMPS (b). En ambos casos, la concentración final de lípido es  $30 \mu\text{M}$ . (B) Variación de intensidad de luz dispersada tras la adición de  $\alpha$ -sarcina ( $0.8 \mu\text{M}$ ) a vesículas de DMPS ( $30 \mu\text{M}$ ) a mayor escala de tiempo (s). Este segundo tipo de registros es el empleado para la determinación de velocidades iniciales. Los ensayos se realizaron a  $42^\circ\text{C}$  para DMPS y a  $37^\circ\text{C}$  para el resto de los lípidos.**

a que la escala de tiempo en la que transcurre el proceso hace necesario el empleo de técnicas de mezcla rápida. Un ejemplo de las curvas de variación de intensidad de luz dispersada frente al tiempo aparece en la figura 23. Las velocidades iniciales del proceso de agregación se han determinado a partir de la pendiente del tramo lineal de variación de la intensidad de luz dispersada (figura 23B). Este análisis se ha llevado a cabo con vesículas compuestas por PG de huevo, PS de cerebro bovino, DMPG y DMPS. Mientras que los registros de la agregación de vesículas de fosfolípidos naturales mostraban el aspecto que aparece en el trazo (a) de la figura 23A, los obtenidos con vesículas de fosfolípidos sintéticos mostraban el que aparece como trazo (b). En la figura 24 aparece un resumen de los resultados obtenidos para diferentes relaciones lípido/proteína. Las velocidades iniciales obtenidas con vesículas de DMPG son entre 4 y 6 veces mayores que las obtenidas con vesículas de PG de huevo, mientras que son similares para ambas fosfatidilserinas, excepto para una concentración de  $60 \mu\text{M}$  en donde la velocidad inicial para DMPS es 1.5 veces mayor que para PS de cerebro bovino. Las velocidades iniciales con vesículas de fosfolípidos naturales son similares.

En la figura 24 se puede observar que para todos los lípidos empleados las velocidades iniciales tienen un comportamiento hiperbólico. La representación logarítmica de las velocidades máximas de agregación frente a la concentración de vesículas es una recta de pendiente 2 para todos los lípidos empleados (figura 24E). Por lo tanto, el proceso de agregación de vesículas inducida por  $\alpha$ -sarcina es de segundo orden con respecto a la concentración de vesículas, al menos en el intervalo de concentraciones de lípido empleado ( $10$  a  $60 \mu\text{M}$ ). Las velocidades iniciales, medidas a nivel de milisegundos, aportan información principalmente de la primera etapa del proceso de agregación. Por lo tanto, la anterior dependencia con respecto a la concentración de vesículas indicaría, por una parte, que la agregación de éstas procede vía formación de un dímero de vesículas como primera etapa, y, por otra, que este proceso es cualitativamente similar para todos los lípidos empleados.

La formación de un dímero puede responder a diferentes esquemas, según la naturaleza del contacto entre las vesículas. En concreto, un dímero podría mantenerse mediante un puente constituido por una única molécula de proteína, o bien, por uno constituido por varias moléculas. De acuerdo con la primera posibilidad, la velocidad inicial de agregación sería inhibida en condiciones en las que las vesículas se encuentran saturadas de proteína, es decir, en condiciones en las que las vesículas libres de moléculas de proteína son cinéticamente limitantes. Sin embargo, tal y como se observa en la figura 24, las velocidades iniciales no disminuyen en ningún caso, incluso a relaciones lípido/proteína tan elevadas como 10:7. Por lo tanto, ha de concluirse que en el manteni-



**Figura 24. Velocidades iniciales del proceso de agregación de vesículas lipídicas ( $R_{in}$ ) producido por  $\alpha$ -sarcina.** Representaciones de las velocidades iniciales (V/s) de variación de luz dispersada producida cuando se añade  $\alpha$ -sarcina a diferentes tipos de vesículas frente a la concentración de proteína ( $\mu$ M): (A) vesículas de PG de huevo; (B) de PS de cerebro bovino; (C) de DMPG; (D) de DMPS. Para cada tipo de fosfolípido aparecen cuatro gráficas diferentes, correspondientes a diferentes concentraciones de lípido: (1) 10  $\mu$ M; (2) 20  $\mu$ M; (3) 30  $\mu$ M; (4) 60  $\mu$ M. Los pesos moleculares promedios de PG y PS que se han considerado son 750 y 805, respectivamente. Las barras representan 0.2 V/s ( $R_{in}$ ). (E) Representación logarítmica de las velocidades máximas de agregación (valores máximos  $R_{in}$  de las figuras A-D;  $R_{in}$  en unidades de V/s) para cada tipo de lípido frente a la concentración del mismo (M): (a) vesículas de PG de huevo; (b) de PS de cerebro bovino; (c) DMPG; (d) DMPS. Los experimentos llevados a cabo con DMPS se realizaron a 42 °C y a 37 °C con el resto de los lípidos.

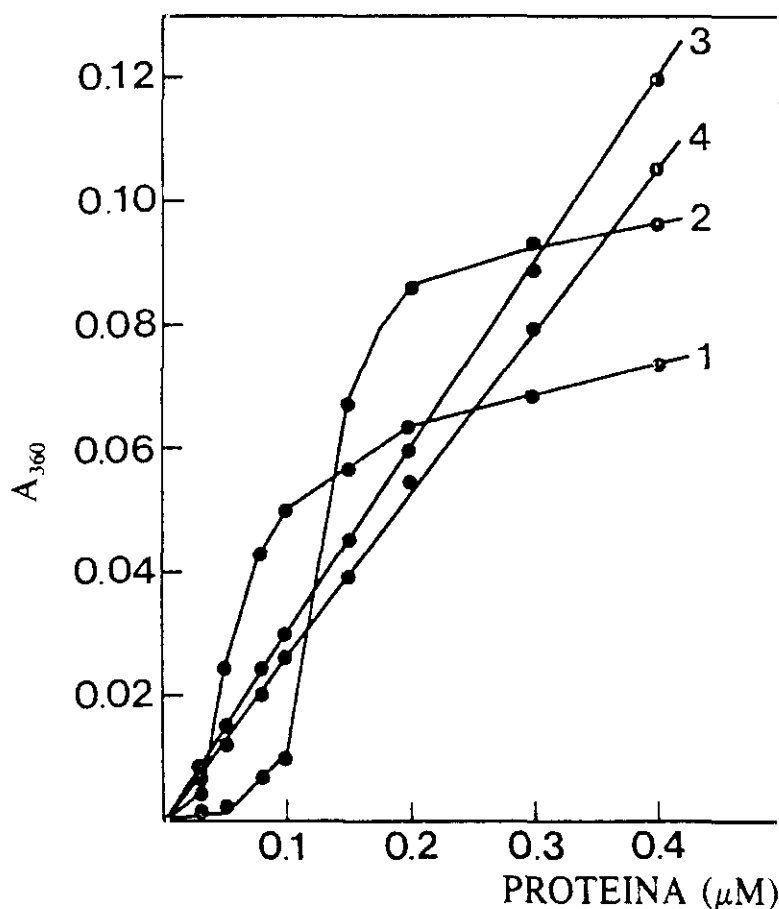


miento del dímero de vesículas están implicadas interacciones proteína-proteína.

La cinética de agregación obtenida con vesículas de fosfolípidos naturales (PG o PS) es claramente distinta a la obtenida con vesículas de fosfolípidos sintéticos (DMPG o DMPS) (figura 23A). Mientras que con estos últimos se observan curvas saturables, en el primer caso se observa una disminución progresiva de la intensidad de luz dispersada, siendo esta disminución menos pronunciada cuanto menor es la concentración de vesículas. Este comportamiento ya ha sido observado anteriormente en otros sistemas, y explicado en términos de la formación de grandes agregados que reducirían el número de partículas dispersantes, con la consiguiente disminución del paso óptico efectivo (Düzgünes *et al.*, 1981). Sin embargo, también tendría que considerarse que la dependencia angular de la dispersión de luz para grandes agregados podría ser significativa, aunque para las vesículas monoméricas ésta sea mínima (Wei *et al.*, 1982). Las diferentes cinéticas observadas podrían indicar que los complejos formados entre la  $\alpha$ -sarcina y las vesículas de fosfolípidos naturales y los sintéticos son diferentes, a pesar de que la primera etapa del proceso de agregación venga caracterizada por un mismo orden de reacción. Este diferente comportamiento entre los fosfolípidos naturales y los sintéticos también se puede deducir de los resultados obtenidos estudiando los valores de absorción a 360 nm de una suspensión de vesículas lipídicas y  $\alpha$ -sarcina en situación de equilibrio (figura 25). Tanto para DMPG como para DMPS se obtienen curvas hiperbólicas, con un tramo inicial prácticamente lineal (Gasset *et al.*, 1989), lo cual no se observa con fosfolípidos naturales. Es más, los valores de absorción obtenidos con DMPG o DMPS son mayores que los obtenidos con PG o PS, tal y como se espera de las curvas de dispersión.

#### **Medidas de las velocidades de mezcla de lípidos por transferencia de energía por resonancia**

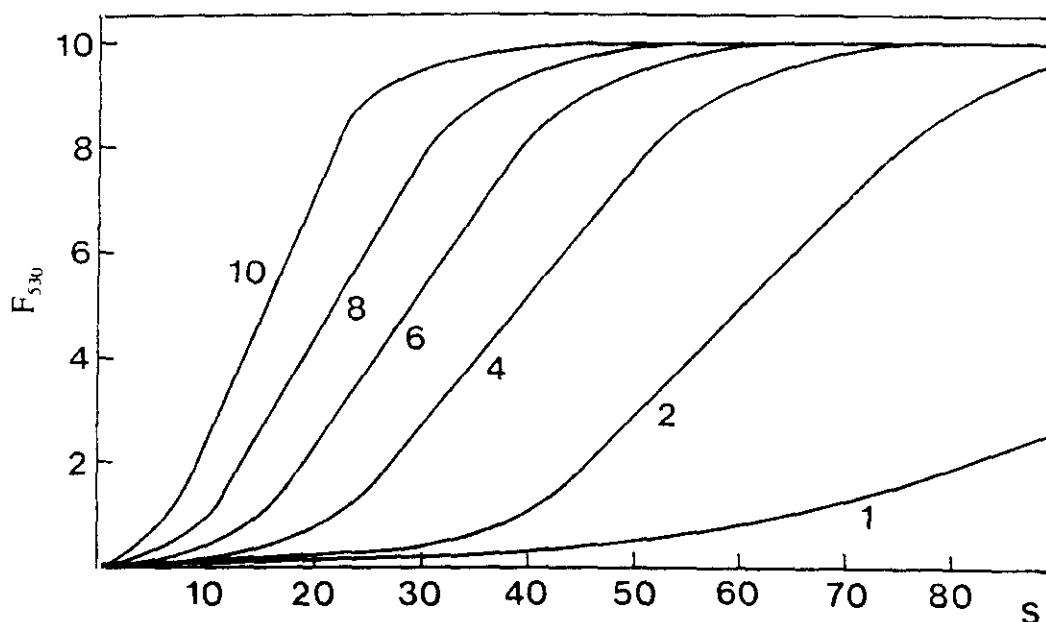
El proceso de mezcla de lípidos producido por la  $\alpha$ -sarcina se ha analizado midiendo la variación de la transferencia de energía por resonancia de un sistema compuesto por vesículas marcadas con 1% NBD-PE (donante) y 0.6% Rh-PE (aceptor) y por vesículas no marcadas en proporción 1:1. El estudio cinético se ha llevado a cabo para vesículas de diferente composición lipídica. Las figuras 4 y 5 resumen los resultados obtenidos con vesículas de DMPG. La adición de  $\alpha$ -sarcina produce mezcla de lípidos tal como se deduce del incremento en la intensidad de fluorescencia del NBD-PE. La figura 26 muestra la cinética de mezcla de lípidos obtenida para una concentración de DMPG 150  $\mu$ M y concentraciones de  $\alpha$ -sarcina comprendidas entre 1 y 10  $\mu$ M. Todas las curvas muestran un comportamiento sigmoideo, resultado de un retraso en el comienzo del pro-



**Figura 25. Aumento de la absorción a 360 nm de disoluciones de vesículas de diferentes tipos de lípidos tras la adición de  $\alpha$ -sarcina.** Representación del incremento de absorción a 360 nm de disoluciones de lípidos tras al adición de  $\alpha$ -sarcina frente a la concentración de ésta ( $\mu$ M): (1) vesículas de PG de huevo (75  $\mu$ M); (2) PS de cerebro bovino (75  $\mu$ M); (3) DMPG (30  $\mu$ M); (4) DMPS (30  $\mu$ M). La cinética de variación de absorción de las diferentes muestras (1 ml volumen total) se determinó en cubetas termostatzadas de 1 cm de paso óptico. Los valores representados son los obtenidos tras la estabilización de dicho valor de absorción. Estos son el promedio de tres diferentes medidas.

ceso. Esto sugiere la existencia de un estado intermedio previo al proceso de mezcla de lípidos propiamente dicho. La velocidad máxima de mezcla de lípidos, calculada del segmento lineal de las curvas de la figura 26, se alcanza tras un periodo de tiempo que varía con la concentración de  $\alpha$ -sarcina; así, cuanto mayor es la concentración de proteína, menor es dicho periodo de tiempo. Este estudio se ha llevado a cabo para diferentes concentraciones de DMPG (entre 15 y 150  $\mu$ M). Las velocidades máximas calculadas de este modo para diferentes concentraciones de  $\alpha$ -sarcina y de DMPG aparecen en la figura 27A. Estas curvas tienden a saturarse a una concentración de  $\alpha$ -sarcina de 10  $\mu$ M aproximadamente. Por lo tanto, las velocidades de mezcla de lípidos a esta concentración

de  $\alpha$ -sarcina se han considerado como valores saturantes. Estas velocidades, en unidades de intensidad de fluorescencia por segundo, se han convertido en unidades de porcentaje de dímeros fusionados por segundo (%fd/s) para poder hacer una comparación directa, independientemente de las diferentes concentraciones de sondas fluorescentes para cada concentración de lípido. Los resultados aparecen en la figura 27B. Es evidente que las velocidades máximas saturantes corresponden a un valor constante de %fd por segundo para todo el intervalo de concentraciones de DMPG considerado (entre 15 y 150  $\mu$ M). Para calcular el orden de reacción del proceso de mezcla de lípido con respecto a la concentración de vesículas, los datos de la figura 27A se han representado como valores de (velocidad de formación de dímeros x concentración) vs (concentración), en una representación doble logarítmica. El resultado es una recta de pendiente uno (recuadro

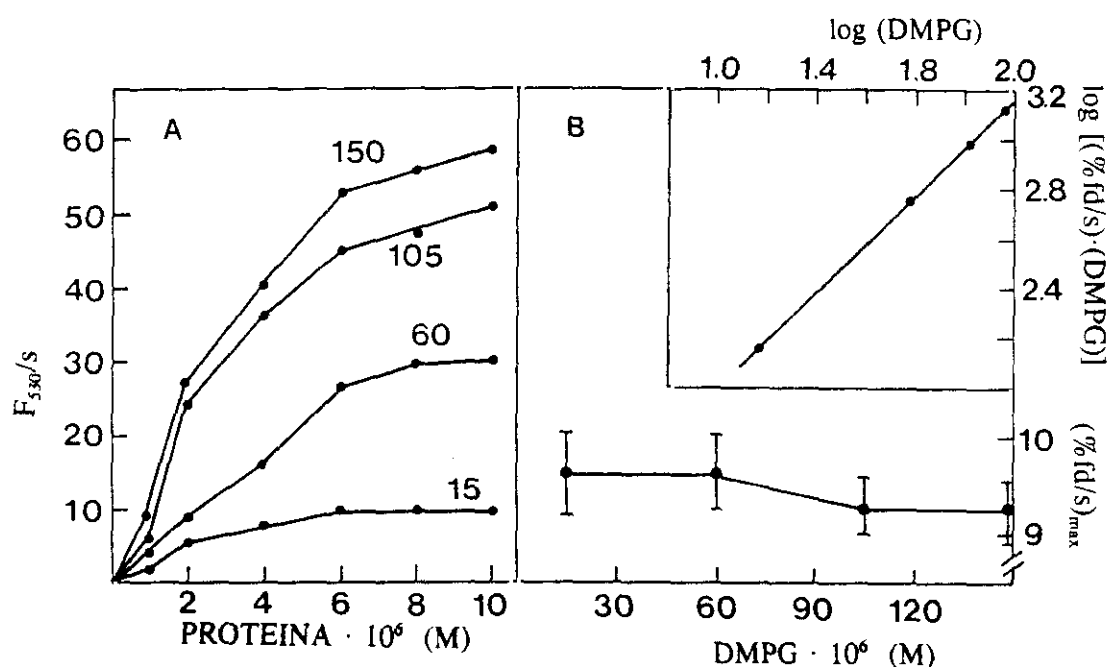


**Figura 26. Estudio cinético de la variación de transferencia de energía producido por  $\alpha$ -sarcina en un sistema de vesículas de DMPG.** La variación de la intensidad de fluorescencia a 530 nm tras excitación a 450 nm ( $F_{530 \text{ nm}}$ ) medida en unidades arbitrarias, se representa frente al tiempo (s). Todos los registros corresponden a una misma concentración de DMPG (150  $\mu$ M), apareciendo la concentración de  $\alpha$ -sarcina indicada en cada caso. La disolución de vesículas estaba formada por dos subpoblaciones: vesículas marcadas (NBD 1%; Rh 0.6%) y vesículas no marcadas, en proporción molar (1:1). Los experimentos se realizaron a 37°C.

figura 27B), lo cual indica que la reacción de mezcla de lípidos es de primer orden respecto a la concentración de fosfolípidos. Este resultado es el esperado si el proceso de fusión como tal se produce a partir de un complejo de vesículas agregadas cuya formación

no es cinéticamente limitante respecto al proceso de desestabilización de las membranas propiamente dicho.

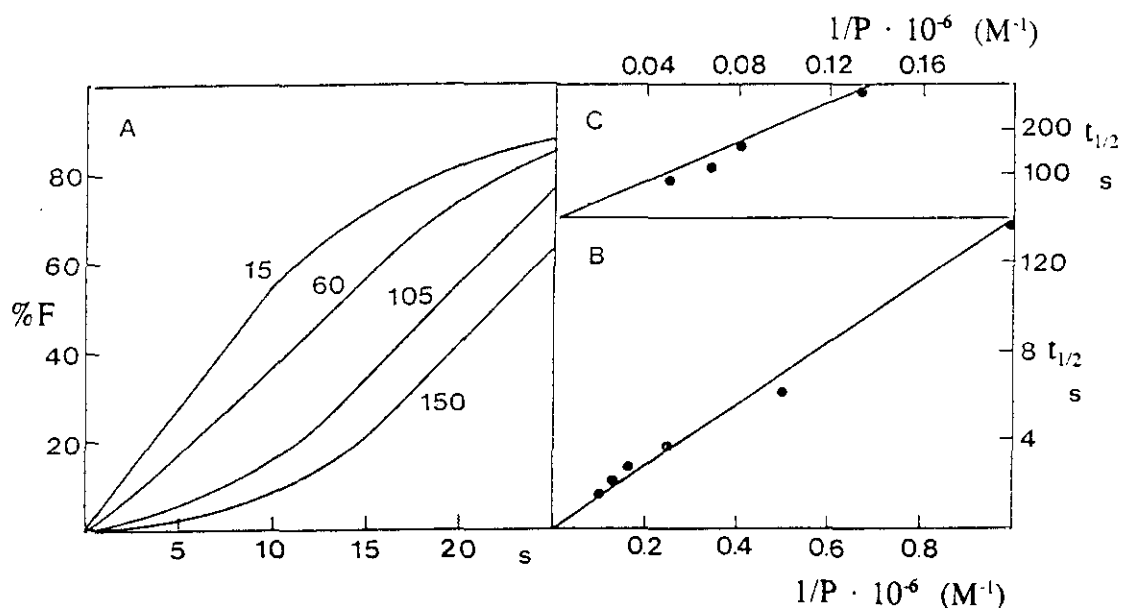
El carácter sigmoideo de las cinéticas de mezcla de lípidos es dependiente de la relación proteína/lípido. En la figura 28A aparecen las cinéticas de variación de intensidad de fluorescencia de NBD-PE para diferentes relaciones molares proteína/DMPG. A la mayor relación considerada aparece un comportamiento hiperbólico, mientras que a medida que la relación proteína/lípido disminuye las cinéticas van siendo progresivamente sigmoideas. Este hecho sugiere que en el estado intermedio responsable del comportamiento sigmoideo están implicadas interacciones proteína-proteína. Para obtener información sobre este proceso se ha definido el parámetro  $t_{1/2}$  como el tiempo necesario para alcanzarse el 50% de la máxima variación de fluorescencia. La representación de los



**Figura 27. Velocidades de mezcla de lípidos producidas por  $\alpha$ -sarcina sobre vesículas de DMPG.** Representaciones de las velocidades de mezcla de lípidos (medida en unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia a 530 nm tras excitación a 450 nm,  $F_{530 \text{ nm}}$ , por segundo;  $F_{530 \text{ nm}}/s$ ) frente a la concentración de proteína (M). Las concentraciones totales de lípido aparecen en cada trazo (15, 60, 105 y 150  $\mu M$ ). Las velocidades se han calculado a partir del tramo lineal de cada cinética, tales como las que aparecen en la figura 26. (B) Representación de las velocidades máximas de mezcla de lípidos expresadas como  $(\%fd/s)_{max} \pm SD$  (véase materiales y métodos) frente a la concentración de lípido (M). (Recuadro) Representación logarítmica de  $[(\%fd/s)_{max} \cdot (DMPG) \mu M]$  frente a la concentración de DMPG ( $\mu M$ ).

valores obtenidos de los  $t_{1/2}$  frente a las inversas de las concentraciones de  $\alpha$ -sarcina (figura 28B) es una recta, lo cual sugiere que el proceso es de segundo orden respecto la concentración de proteína.

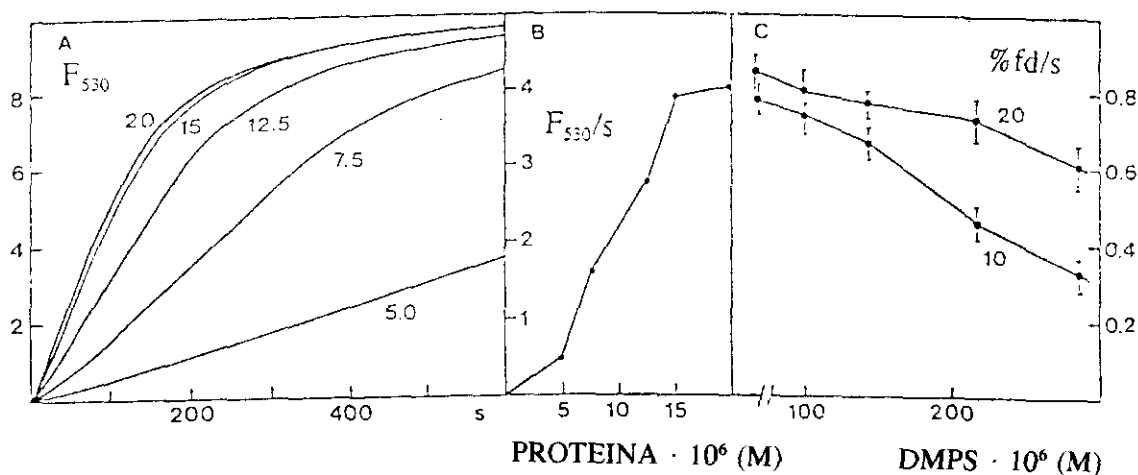
Este tipo de ensayo también se ha realizado con vesículas compuestas por DMPS. La figura 29A muestra las cinéticas de mezcla de lípidos para 70  $\mu$ M DMPS y diferentes concentraciones de  $\alpha$ -sarcina (entre 5 y 20  $\mu$ M). El proceso es sensiblemente más lento que el observado con vesículas de DMPG (figura 26). En la figura 29B aparece una representación de las velocidades máximas frente a la concentración de proteína. Las velocidades máximas tienden a saturarse a una concentración de  $\alpha$ -sarcina de 20  $\mu$ M para



**Figura 28. Cinéticas de variación de intensidad de fluorescencia a 530 nm normalizada, tras excitación a 450 nm.** (A) La intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias, pero las mismas que las consideradas en las figuras 4 y 5) se expresan como porcentaje de la correspondiente variación máxima para cada concentración de fosfolípido (%F), con la finalidad de poder comparar las diferentes cinéticas realizadas con diferentes concentraciones de lípido. Se representa %F530 nm frente al tiempo (s). Los cuatro trazos que aparecen corresponden a diferentes concentraciones de DMPG (15, 60, 105, 150  $\mu$ M) para una concentración de  $\alpha$ -sarcina (10  $\mu$ M). (B) Representación de los valores de  $t_{1/2}$  (s) frente a la inversa de la concentración de  $\alpha$ -sarcina ( $1/P$ ) ( $\text{M}^{-1}$ ), para una concentración de DMPG (150  $\mu$ M). (C) representación similar a (B) pero con resultados obtenidos con vesículas de DMPS (70  $\mu$ M). Los experimentos con DMPG se realizaron a 37°C, mientras que con DMPS se empleó 42°C.

70  $\mu\text{M}$  DMPS. Sin embargo, para mayores concentraciones de lípido se requieren mayores concentraciones de  $\alpha$ -sarcina. En la figura 29C aparece un resumen de los resultados obtenidos para concentraciones de  $\alpha$ -sarcina de 10 y 20  $\mu\text{M}$  para un intervalo de concentraciones de DMPS entre 70 y 285  $\mu\text{M}$ . La velocidad de mezcla de lípido en unidades de  $\%fd/s$  disminuye a medida que aumenta la relación lípido/proteína. Este resultado está de acuerdo con los datos de unión de  $\alpha$ -sarcina a este tipo de lípido. A concentraciones mayores de 100  $\mu\text{M}$  de DMPS, las vesículas no están saturadas por la proteína en el intervalo de concentraciones empleado debido a la más baja afinidad relativa por este tipo de fosfolípido que por DMPG.

La mezcla de lípidos también se ha estudiado con vesículas compuestas por fosfolípidos naturales, PG de huevo o PS de cerebro bovino. En las mismas condiciones que para DMPS, no se ha detectado mezcla de lípidos para PS bovina, mientras que para PG de huevo sí, pero a una velocidad 3000 veces menor que para DMPG.



**Figura 29. Estudio cinético de la mezcla de lípidos producida por  $\alpha$ -sarcina con vesículas de DMPS.** (A) Cinética de variación de intensidad de fluorescencia a 530 nm tras excitación a 450 nm ( $F_{530 \text{ nm}}$ ) (medida en unidades arbitrarias, pero las mismas que las consideradas anteriormente). Todos los trazos corresponden a una misma concentración de DMPS (70  $\mu\text{M}$ ), siendo las concentraciones de  $\alpha$ -sarcina las que aparecen indicadas. Se empleó una mezcla (1:1) de vesículas marcadas (NBD 1%; Rh 0.6%) y vesículas no marcadas. (B) Velocidades de mezcla de lípidos medidas en unidades de  $F_{530 \text{ nm}}/s$  frente a la concentración de  $\alpha$ -sarcina (M). La concentración de fosfolípido fue 70  $\mu\text{M}$ . Las velocidades se calcularon a partir del tramo lineal de las correspondientes cinéticas (A). (C) Dependencia de los valores máximos de velocidad de mezcla de lípidos correspondientes a dos concentraciones de  $\alpha$ -sarcina (10 y 20  $\mu\text{M}$ ) en unidades de ( $\%fd/s$ ) frente a la concentración de DMPS (M). Todos los experimentos se llevaron a cabo a 42°C.

En sistemas heterogéneos compuestos por vesículas de fosfolípidos sintéticos y vesículas de fosfolípidos naturales (DMPG + PG) o (DMPS + PS), el estudio se ha llevado a cabo de dos modos diferentes, en un caso las vesículas marcadas eran las constituidas por fosfolípidos naturales y en el otro lo eran las de fosfolípidos sintéticos. En los cuatro casos considerados se ha visto mezcla de lípidos, lo cual implica necesariamente que ambos tipos de fosfolípidos participan en la reacción de fusión. En la tabla I se resumen los resultados de estos estudios. Todos los valores son apreciablemente menores que los obtenidos con los sintéticos. Un aspecto interesante es que los valores de mezcla de lípidos son diferentes según qué tipo de vesículas sean las marcadas. Así las velocidades son entre 5 y 6 veces mayores cuando las sondas están incorporadas en las vesículas de fosfolípidos sintéticos. Los valores de anisotropía de fluorescencia de DPH incorporado en vesículas de DMPG o PG a 37°C son 0.070 y 0.064, respectivamente, mientras que para DMPS y PS son 0.092 y 0.066, respectivamente. Este parámetro se puede relacionar con la fluidez de membrana, por lo que según esto, las vesículas de fosfolípidos naturales serían más fluidas que las de fosfolípidos sintéticos. Siguiendo este razonamiento, las mayores velocidades de mezcla de lípido se obtienen cuando las sondas han de diluirse desde una bicapa menos fluida a otra más fluida, es decir, desde vesículas de fosfolípidos sintéticos a vesículas de fosfolípidos naturales.

## DISCUSION

La citotoxina  $\alpha$ -sarcina produce agregación (Gasset *et al.*, 1989) y fusión (Gasset *et al.*, 1990) de vesículas compuestas por fosfolípidos ácidos. Las micrografías de criofractura ponen de manifiesto que las vesículas unilamelares de DMPG fusionan para formar vesículas multilamelares a relaciones bajas de  $\alpha$ -sarcina/lípido, mientras que a altas relaciones  $\alpha$ -sarcina/lípido éste se organiza en estructuras planas. Tales estructuras representan estados finales de interacción, pues el sistema se encuentra en equilibrio. Estos resultados indican que la proteína promueve reordenaciones drásticas de las estructuras lipídicas. Las primeras etapas de la interacción  $\alpha$ -sarcina lípido se producen en una escala de tiempo muy pequeña, por lo que su estudio requiere el empleo de técnicas de mezcla rápida (técnicas de flujo detenido). La adición de  $\alpha$ -sarcina a una suspensión de vesículas de fosfolípidos ácidos produce un aumento en la intensidad de luz dispersada a nivel de milisegundos (figura 23). Las medidas de las velocidades iniciales de esta variación revelan que el proceso es de segundo orden con respecto a la concentración de fosfolípido. Esto se interpreta en términos de la formación de un dímero de vesículas como etapa inicial del proceso de agregación.

La velocidad inicial de agregación de vesículas (figura 24) no se inhibe a altas relaciones proteína/lípido, condiciones en las que las vesículas libres de moléculas de proteína se convierten en cinéticamente limitantes para cualquier proceso en el que intervengan. Esto indicaría que el puente proteico que agrega los monómeros de vesículas no está formado por una sola molécula de proteína como ocurre, por ejemplo, con la agregación de vesículas inducida por poli-lisina, en donde, tras alcanzarse una velocidad máxima, este parámetro disminuye a mayores relaciones péptido/lípido (Lampe *et al.*, 1983). En el caso de la agregación inducida por  $\alpha$ -sarcina, las velocidades son saturables,

**TABLA I. Velocidades iniciales de mezcla de lípidos inducida por  $\alpha$ -sarcina en sistemas de vesículas de PG y DMPG, y de PS y DMPS.**

Concentración de $\alpha$ -sarcina ( $\mu$ M)	Concentración total de fosfolípido (mg/ml)					
	200		100		50	
	A <sup>†</sup>	B <sup>‡</sup>	A	B	A	B
Vesículas de PG						
20	1.290	7.070	1.005	5.380	0.763	2.600
15	0.825	4.570	0.698	4.400	0.493	2.470
Vesículas de PS						
20	0.260	1.640	0.180	1.050	0.103	0.610
15	0.190	1.040	0.160	0.780	0.085	0.450

Los valores las velocidades iniciales se expresan como  $F_{530}/s$  (emisión de fluorescencia en unidades arbitrarias).

<sup>†</sup> Ensayos de tipo A: el sistema de transferencia de energía está compuesto por (NBD-PE/Rh-PE)-PG y DMPG sin marcaje (parte 1) y (NBD-PE/Rh-PE)-PS y DMPS (parte 2). En todos los casos, la relación entre vesículas marcadas y vesículas no marcadas es (1:1).

<sup>‡</sup> Ensayos de tipo B: el sistema de transferencia de energía está compuesto por (NBD-PE/Rh-PE)-DMPG y PG (parte 1) y (NBD-PE/Rh-PE)-PS y DMPS (parte 2).

no observándose inhibición a altas relaciones proteína/lípido, lo cual indicaría que en la formación del dímero están implicadas interacciones proteína-proteína, como previamente



se ha descrito para la agregación de vesículas inducida por la proteína básica de la mielina (Lampe *et al.*, 1983). Sin embargo, en este caso la dependencia de la agregación con la concentración de proteína es cooperativa; es decir, existe una proporción proteína/lípido crítica a partir de la cual se produce la agregación. La explicación aportada por los autores se basa en la elevada inestabilidad de los agregados cuando la relación proteína/lípido es baja. Esta estabilidad aumentaría a medida que lo hace dicha relación, condiciones en las que existiría una mayor densidad de entrecruzamientos entre vesículas. Sin embargo, el comportamiento observado con la  $\alpha$ -sarcina no muestra esta fase de retraso con respecto a la concentración de proteína, por lo que habría que concluir que la estabilidad de los complejos de agregación es lo suficientemente elevada como para darse incluso a muy bajas relaciones proteína/lípido.

Los resultados obtenidos de las medidas de velocidades iniciales también indican que, aunque en el mantenimiento del dímero de vesículas intervengan más de una molécula de  $\alpha$ -sarcina, las interacciones proteína-proteína no resultan cinéticamente limitantes para el proceso global de agregación. De hecho, de ser así, debiera observarse una dependencia sigmoidea de las velocidades iniciales con respecto a la concentración de proteína. Asimismo, se puede excluir la existencia de un proceso de agregación mantenido por un agregado de moléculas de proteína formado previamente a la interacción con las vesículas. De hecho, no se han detectado agregados de  $\alpha$ -sarcina, en el intervalo de concentraciones empleado, incluso en presencia de reactivos de entrecruzamiento.

Tras el proceso de agregación de vesículas, la  $\alpha$ -sarcina produce una desestabilización de la bicapa. En este sentido, la  $\alpha$ -sarcina accede lo suficiente al interior hidrofóbico de la bicapa para ser marcada con una sonda fotoactivable localizada en el carbono 12 de la cadena de acilo del fosfolípido (Gasset *et al.*, 1991a). La adición de  $\alpha$ -sarcina a una suspensión de vesículas de fosfolípidos ácidos produce una pérdida de la transferencia de energía por resonancia en un ensayo típico de dilución de sondas (Struck *et al.*, 1981). Este resultado se interpreta en términos de existencia de mezcla de lípidos entre diferentes bicapas promovido por la proteína. Este proceso es más lento que el reflejado por dispersión de luz a  $90^\circ$ , ya que requiere más tiempo para completarse considerando todo el intervalo de concentraciones de lípido estudiado. Las cinéticas de variación de intensidad de fluorescencia tienen un carácter sigmoideo, es decir, ha de transcurrir un lapso de tiempo hasta el desencadenamiento del proceso (figura 26). Las medidas de velocidades máximas revelan que el proceso es de primer orden respecto a la concentración de lípido, tal y como cabría esperar si el proceso ocurriese según un esquema que considerase las etapas siguientes: vesículas  $\rightarrow$  dímero de vesículas  $\rightarrow$  vesícula fusionada. Pero, de acuerdo con este mecanismo, el orden de reacción aparente sería 2 si la

concentración de vesículas es lo suficientemente baja como para que la etapa de formación de dímeros se convierta en la etapa limitante de la velocidad, como es el caso de la mezcla de lípidos de fosfatidilserina inducida por cationes divalentes (Walter y Siegel, 1993). Sin embargo, tal dependencia de segundo orden no se observa, incluso a las concentraciones de vesículas más bajas de entre las empleadas; es decir, la etapa limitante de la velocidad del proceso global de mezcla de lípidos no es la formación de dímeros. Esto lo único que significa es que la constante de velocidad del proceso de agregación de vesículas es mayor que la de mezcla de lípidos. Sin embargo, incluso considerando este hecho, la dependencia de primer orden observada en todo el intervalo de concentraciones de vesículas estudiado, indicaría que la etapa de mezcla de lípidos ocurre predominantemente a partir de agregados de vesículas de mayor orden que el de dímero. Esto explicaría el retraso observado en el desencadenamiento del proceso de mezcla de lípidos, retraso que es dependiente de la concentración de proteína (figuras 4 y 6). De hecho, en el tiempo que se requiere para observar mezcla de lípidos ya se han formado agregados de vesículas mayores que dímeros. Por lo tanto, el proceso de mezcla de lípidos inducido por  $\alpha$ -sarcina no puede modelizarse como anteriormente se especificó, sino que se hace necesaria la incorporación de una etapa intermedia entre dímeros y vesículas fusionadas que sería la de formación de agregados de vesículas de un orden mayor que el de dímeros. Esto puede correlacionarse con el hecho de que se requieran interacciones entre moléculas de proteína para la formación del agregado de vesículas, tal y como se dedujo de los estudios de dispersión de luz a  $90^\circ$ . La dependencia de segundo orden con respecto la concentración de  $\alpha$ -sarcina que se observa para la etapa de mezcla de lípidos sugiere que se requieren interacciones proteína-proteína, al menos en una etapa del proceso. De hecho, un agregado de vesículas implica a numerosas moléculas de  $\alpha$ -sarcina y la mezcla de lípidos ocurre en dicho agregado.

Cuando se estudian vesículas compuestas por fosfolípidos naturales, PG de huevo o PS de cerebro bovino, no se observa mezcla de lípidos aunque sí agregación de estas vesículas. La diferente respuesta ante unos y otros, se podría pensar que reside en las diferencias de fluidez que presentan unas vesículas con respecto de las otras, ya que ambos tipos de fosfolípidos, compartiendo la misma cabeza polar, difieren en la composición de las cadenas de acilo. Tal composición para los fosfolípidos naturales proporcionaría una mayor fluidez que en el caso de los dimiristoil-fosfolípido. Sin embargo, las diferencias de fluidez determinadas mediante medidas de anisotropía de fluorescencia de DPH, no son lo suficientemente importantes como para explicar la ausencia de mezcla de lípidos. Esta aparente discrepancia entre los resultados obtenidos con diferentes tipos de fosfolípidos que compartiendo la misma cabeza polar difieren en la composición de las cadenas de acilo, ya ha sido observada anteriormente. Así, Walter y Siegel (1993) han observado que,

aunque las vesículas de POPS agregan en presencia de cationes divalentes, no presentan mezcla de lípidos, mientras que las compuestas por PS de cerebro bovino sí lo presentan en las mismas condiciones experimentales. El diferente comportamiento se ha relacionado con la composición y distribución de las cadenas de acilo de estos fosfolípidos. Estos autores concluyeron que las velocidades de desestabilización de la bicapa, para el sistema de PS, pueden controlarse por factores diferentes al relativo a la química de la cabeza polar o a la transición de fase del fosfolípido. Asimismo, Eklund (1990) ha observado que las vesículas compuestas por fosfolípidos que presentan cadenas de acilo totalmente saturadas (DMPG y DPPS) fusionan en presencia de cationes monovalentes, mientras que no se observa fusión con las compuestas por cadenas de acilo con insaturaciones (PG o PS). Estos experimentos fueron llevados a cabo con vesículas preparadas en ausencia de  $\text{Na}^+$ , por lo que la posterior adición de este catión monovalente al medio supondría la aparición de un gradiente de concentraciones significativo a través de la bicapa. A este respecto, se ha sugerido que la protonación de la superficie interna de la bicapa de vesículas de PS obtenidas por sonicación podría ser la responsable de la estabilidad termodinámica de estas vesículas (Demel *et al.*, 1987). Por lo tanto, la fusión podría producirse con las vesículas menos estables en las condiciones del estrés creado por el gradiente de  $\text{Na}^+$ . También se ha sugerido que el aumento del número de insaturaciones de las cadenas de acilo en las membranas modifica de alguna forma la red de puentes de hidrógeno interlipídicos en los que intervienen moléculas de agua, y que el proceso es independiente de los efectos sobre el orden lipídico (Slater *et al.*, 1993). Por lo tanto, podría especularse que la  $\alpha$ -sarcina promueve la mezcla de lípidos a partir de un estado de agregación de un orden mayor que el de dímero, cuando las vesículas están compuestas por fosfolípidos que poseen cadenas de acilo totalmente saturadas, debido a la diferente red de puentes de hidrógeno que poseen cuando se comparan con la existente en las vesículas compuestas por fosfolípidos naturales.

La  $\alpha$ -sarcina produce mezcla de lípidos cuando en el medio existen vesículas compuestas por fosfolípidos naturales y vesículas compuestas por fosfolípidos sintéticos. Tal proceso sólo se produce a través de una desestabilización de la bicapa. La  $\alpha$ -sarcina promueve agregación de ambos tipos de vesículas pero únicamente es capaz de desestabilizar las compuestas por fosfolípidos sintéticos. Este conjunto de resultados llevaría a concluir que la desestabilización promovida por la  $\alpha$ -sarcina en las vesículas de DMPG se transmitiría a las vesículas de fosfolípidos naturales. Considerando que la formación de un dímero de vesículas implica numerosas moléculas de  $\alpha$ -sarcina, y que la desestabilización de la bicapa requiere interacciones proteína-proteína, podría pensarse que tal interacción sería el vehículo por el cual se transmite tal desestabilización. En este sentido, cabe decir que la  $\alpha$ -sarcina sufre un cambio conformacional cuando interacciona

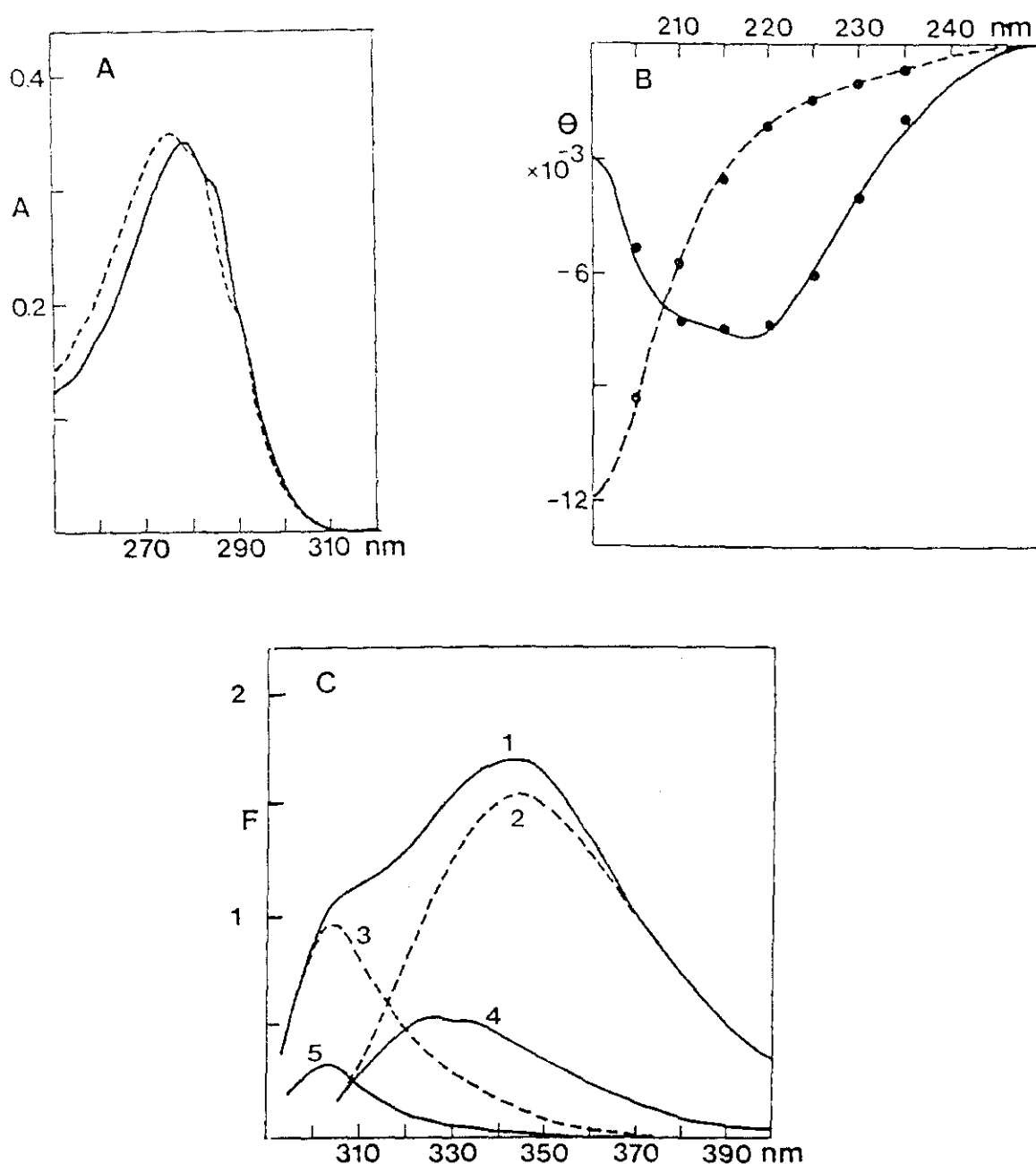
con vesículas de DMPG (Gasset *et al.*, 1991b). Una posible explicación para el comportamiento observado en los sistemas heterogéneos podría ser la siguiente: como consecuencia de la desestabilización de la bicapa producida por la  $\alpha$ -sarcina en las vesículas de fosfolípidos sintéticos, la proteína sufriría un cambio conformacional. Este cambio modificaría, mediante interacciones proteína-proteína, la conformación de otra(s) molécula(s) de proteína unida(s) a la membrana de fosfolípidos naturales y tal cambio promovería su desestabilización. Esta hipótesis implicaría la existencia de dos tipos diferentes de conformación de la  $\alpha$ -sarcina, una en presencia de vesículas de fosfolípidos sintéticos y otra en presencia de vesículas de fosfolípidos naturales. En este sentido, ya se ha descrito que la rodanasa muestra diferentes conformaciones según esté unida a cardiolipina o a fosfatidil serina (Zardeneta y Horowitz, 1993). Sin embargo, no se pueden descartar otras posibilidades. La interacción de la  $\alpha$ -sarcina con ambos tipos de vesículas podría resultar en una diferente modificación de la superficie de hidratación de las mismas. En el sistema heterogéneo, en condiciones de agregación, tal modificación podría conducir a mezcla de lípidos entre las vesículas. Las vesículas compuestas por fosfolípidos naturales o por fosfolípidos sintéticos podrían exhibir una diferente superficie de hidratación, independientemente de la coincidencia de la cabeza polar, ya que, como se ha indicado anteriormente, la existencia de insaturaciones implicaría una perturbación en la red de puentes de hidrógeno de la superficie de la bicapa (Slater *et al.*, 1993). Asimismo, también se han observado cambios en los espectros de infrarrojo tras la adición de cationes divalentes a dispersiones de fosfatilserina, cambios que se han interpretado en términos de modificaciones del patrón de puentes de hidrógeno establecidos (Hübner *et al.*, 1994).

En resumen, la  $\alpha$ -sarcina agrega vesículas compuestas por fosfolípidos ácidos. Este proceso se inicia con la formación de un dímero de vesículas que resulta mantenido por puentes proteína-proteína. Una vez que transcurre la agregación, se produce la desestabilización de las bicapas, desestabilización que conduce a la mezcla de lípidos. Este proceso está relacionado con la presencia de vesículas compuestas por fosfolípidos con cadenas de acilo totalmente saturadas. Esta desestabilización puede ser transmitida a vesículas compuestas por fosfolípidos naturales.

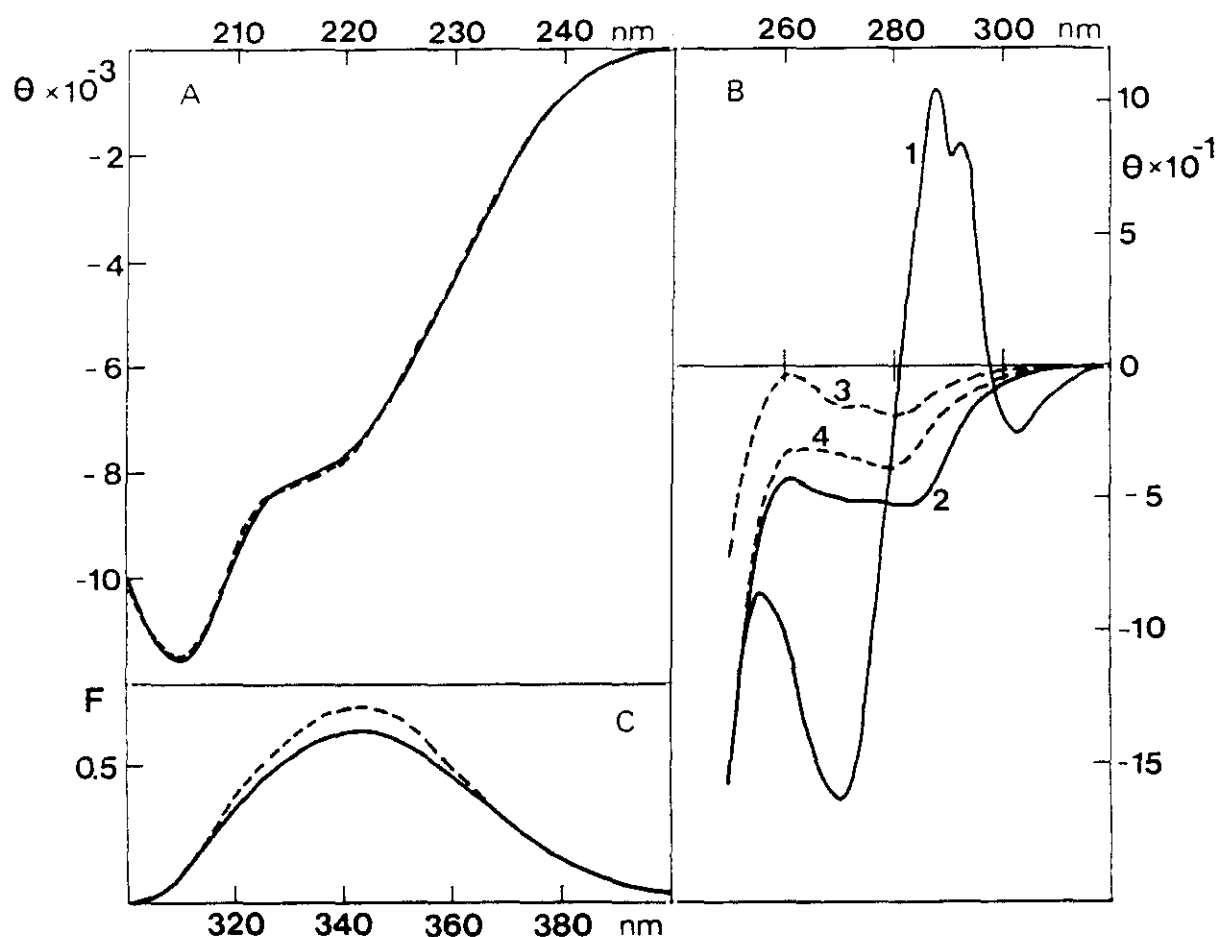
## 5. CARACTERIZACION ESPECTROSCOPICA DE LA $\alpha$ -SARCINA REDUCIDA Y CARBOXIAMIDOMETILADA. ANALISIS DE LOS REQUERIMIENTOS ESTRUCTURALES PARA LA INTERACCION HIDROFOBICA CON BICAPAS LIPIDICAS

### Caracterización espectroscópica de la $\alpha$ -sarcina reducida y carboxiamidometilada.

El análisis de aminoácidos de la  $\alpha$ -sarcina reducida y carboxiamidometilada ( $\alpha$ -SRC) revela la presencia de 4 carboximetil-cisteínas, indicando que la reacción de modificación ha sido completa. Esta modificación química desnaturaliza la proteína según se deriva de su caracterización espectroscópica (figura 30). En primer lugar, el espectro de absorción UV está desplazado hacia el azul cuando se compara con el de la proteína nativa, resultado esperable si los cromóforos de la proteína se encuentran en un entorno más polar tras la desnaturalización. El máximo de absorción de la  $\alpha$ -sarcina nativa se encuentra a 278 nm mientras que en la  $\alpha$ -SRC aparece a 275 nm (figura 30A). En segundo lugar, el espectro de dicroísmo circular (CD) de la  $\alpha$ -SRC en la región del enlace peptídico (figura 30B), indica una fuerte contribución de estructura secundaria no ordenada (banda con un mínimo de absorción por debajo de 200 nm), y una contribución mínima de estructura  $\alpha$ -hélice (el valor de elipticidad negativa a 220 nm es muy bajo). El análisis de este espectro de dicroísmo circular revela la presencia de elementos residuales de estructura secundaria, giros y estructura  $\beta$  (figura 30B). Asimismo, la pérdida de las bandas de dicroísmo en el UV-próximo tras la modificación es significativo de la ausencia de estructura terciaria. Las mismas conclusiones pueden derivarse de los estudios de fluorescencia de la  $\alpha$ -SRC (figura 30C). El espectro de emisión de fluorescencia de la proteína cuando ésta se excita a 275 nm muestra dos máximos centrados en torno a los 305 y 345 nm, respectivamente. La contribución de los residuos de triptófano y tirosina puede determinarse separadamente comparando este espectro con el obtenido cuando la muestra se excita a 295 nm, longitud de onda donde la absorción de los residuos de tirosina es menor del 10% que a 275 nm. La comparación ha de realizarse entre el espectro de emisión para una longitud de onda de 275 nm (contribución de triptófanos y tirosinas; espectro 1 en la figura 30C) y el espectro de emisión cuando se excita a 295 nm normalizado (contribución específica de triptófanos; espectro 2 figura 30C). La banda de emisión de las tirosinas está centrada en torno a los 305 nm, mientras que el único máximo debido a los residuos de triptófano aparece en torno a los 345 nm. El espectro de emisión de fluorescencia de ambos fluoróforos individualmente es diferente a los obtenidos con la  $\alpha$ -sarcina nativa (figura 30C, espectros 4 y 5). La modificación química produce un aumento de aproximadamente 3 veces en la intensidad de fluorescencia de las tirosinas,



**Figura 30. Caracterización espectroscópica de la  $\alpha$ -SRC.** (A) Espectros de absorción (medidos en cubetas de 1 cm de paso óptico) de  $\alpha$ -sarcina nativa (—) y  $\alpha$ -SRC (---). (B) Espectro de dicroísmo en la región del enlace peptídico (UV-lejano) de  $\alpha$ -sarcina nativa (—) y  $\alpha$ -SRC (---). Los valores de elipticidad se expresan en unidades de  $\text{grados} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ . Se representan los valores teóricos (●) correspondientes a espectros con los siguientes porcentajes de estructura secundaria: 21%  $\alpha$ -hélice, 33% lámina  $\beta$  antiparalela, 18% giros  $\beta$  y 28% estructura no ordenada, para  $\alpha$ -sarcina nativa; y, 21% lámina  $\beta$  antiparalela, 17% giros  $\beta$  y 62% estructura no ordenada para  $\alpha$ -SRC. Estos valores se han calculado de acuerdo a Perczel *et al.* (1991). (C) Espectros de emisión de fluorescencia (los valores de intensidad de fluorescencia se expresan en unidades arbitrarias) de  $\alpha$ -SRC, para excitación a 275 nm (espectro 1); para excitación a 295 nm, normalizado para la emisión de residuos de triptófano (espectro 2); espectro diferencia (1 menos 2) (espectro 3); espectros de emisión de fluorescencia de  $\alpha$ -sarcina nativa, (espectro 4) contribución de triptófanos y (espectro 5) contribución de tirosinas. Todas las disoluciones de proteína se prepararon en Mops 50 mM, pH 7.0, con NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM.



**Figura 31. Espectros de emisión de fluorescencia y dicroísmo circular de  $\alpha$ -SRC en presencia de TFE.** (A) Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano (región del enlace peptídico) de la  $\alpha$ -sarcina nativa (—) y de la  $\alpha$ -SRC (---) en presencia de 65% TFE. Los valores de elipticidad se expresan en unidades de  $\text{grados} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ . (B) Espectros de dicroísmo circular en el UV-próximo (región de los residuos aromáticos) de la  $\alpha$ -sarcina nativa (—) y de la  $\alpha$ -SRC (---) (espectros 1 y 3 en ausencia de TFE; espectros 2 y 4 en presencia de 65% TFE). Las unidades de elipticidad son las mismas que las de la parte A. (C) Espectros de emisión de fluorescencia de la  $\alpha$ -sarcina nativa (—) y  $\alpha$ -SRC (---) para excitación a 295 nm, en presencia de 65% TFE. Las unidades de intensidad de fluorescencia son las mismas que las de la figura 30).

sin apreciarse cambio alguno en la posición del máximo de emisión. En la  $\alpha$ -sarcina nativa no se observa transferencia de energía entre los residuos de tirosina y triptófano (Martínez del Pozo *et al.*, 1988), por lo tanto, el aumento de la intensidad de fluorescencia de los

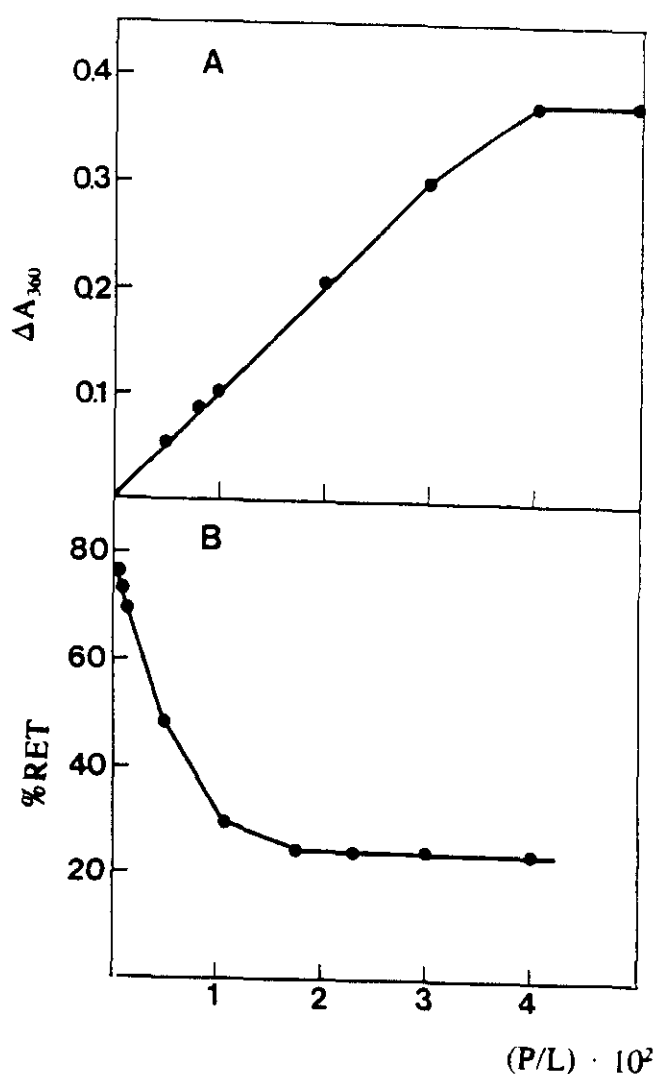
residuos de tirosina no puede atribuirse a la eliminación de tal proceso. Podría deberse, sin embargo, a una disminución del apagamiento estático producido por grupos adyacentes a las tirosinas como consecuencia del cambio conformacional producido por la modificación química. Un aumento similar en intensidad de fluorescencia se ha observado en la  $\alpha$ -sarcina a consecuencia de una transición desnaturalizante inducida por pH ácido (Martínez del Pozo *et al.*, 1988). En lo que se refiere a la emisión de los residuos de triptófano, en la  $\alpha$ -sarcina nativa se observan dos máximos, uno a 325 nm y otro a 335 nm (figura 30C, espectro 4). La aparición de un único máximo en el espectro de emisión de fluorescencia de la  $\alpha$ -SRC, así como el hecho de que aparezca desplazado hacia el rojo comparado con los de la  $\alpha$ -sarcina nativa, es indicativo de que ambos fluoróforos han pasado a un entorno de mayor polaridad, lo cual es característico de una proteína desnaturalizada. La intensidad de fluorescencia de la  $\alpha$ -SRC se multiplica aproximadamente 3 veces en comparación con la de la  $\alpha$ -sarcina nativa. Un aumento similar se observa en una transición conformacional que ocurre a pH 8.0 y que se atribuye a la desprotonación del grupo  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la proteína (Martínez del Pozo *et al.*, 1988). En resumen, todos los datos espectroscópicos indican que la  $\alpha$ -SRC es una proteína desnaturalizada. Este hecho es corroborado a su vez por la pérdida de actividad ribonucleasa. La  $\alpha$ -sarcina nativa, cuando actúa sobre el RNA ribosómico 28S, produce un fragmento de aproximadamente 400 nucleótidos, el fragmento  $\alpha$ , por la hidrólisis de un único enlace fosfodiéster (Wool *et al.*, 1990). Este fragmento no es producido por la  $\alpha$ -SRC en condiciones experimentales en las que sí lo produce la  $\alpha$ -sarcina nativa. Finalmente, cabe decir que las características espectroscópicas de la  $\alpha$ -SRC no varían, al menos durante una semana, cuando la proteína se incubaba a 4°C ó 37°C. Por todo ello, la  $\alpha$ -SRC puede considerarse una proteína desnaturalizada estable que no sufre un proceso de replegamiento.

**El trifluoroetanol promueve una conformación en la  $\alpha$ -SRC espectroscópicamente similar a la adquirida por la  $\alpha$ -sarcina nativa**

El trifluoroetanol (TFE) es un agente que promueve la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares en polipéptidos, disminuyendo el número de este tipo de interacciones entre los enlaces peptídicos y el disolvente (Nelson y Kallenbach, 1986); la consecuencia de esto es la generación de estructuras secundarias ordenadas en dichos polipéptidos. El efecto del TFE sobre las estructuras secundarias de la  $\alpha$ -sarcina nativa y la  $\alpha$ -SRC se ha estudiado mediante dicroísmo circular (CD) y fluorescencia. En presencia de TFE ambas proteínas muestran un espectro de CD similar, tanto en la región del UV-lejano como en el UV-próximo, así como un espectro parecido de emisión de fluorescencia (figura 31). Los espectros de CD en la región del enlace peptídico, corresponderían a una



**Figura 32. Agregación y mezcla de lípidos de vesículas de fosfolípidos por  $\alpha$ -SRC.** (A) Aumento de la absorción a 360 nm ( $\Delta A_{360 \text{ nm}}$ ) producido por la interacción de la  $\alpha$ -SRC con vesículas de DMPG (30 nmoles) a diferentes relaciones molares. Los resultados representan el promedio de tres medidas independientes. (B) Efecto de la  $\alpha$ -SRC sobre la eficacia de la transferencia de energía (%ET) entre las sondas NBD-PE (donador) y Rh-PE (aceptor) incorporadas en vesículas unilamelares de DMPG (DMPG/NBD-PE/Rh-PE a una relación molar 98.4:1:0.6). El ensayo se realizó con una proporción de vesículas marcadas a no marcadas de (1:9), siendo la concentración total de fosfolípido 150 ( $\mu\text{M}$ ).



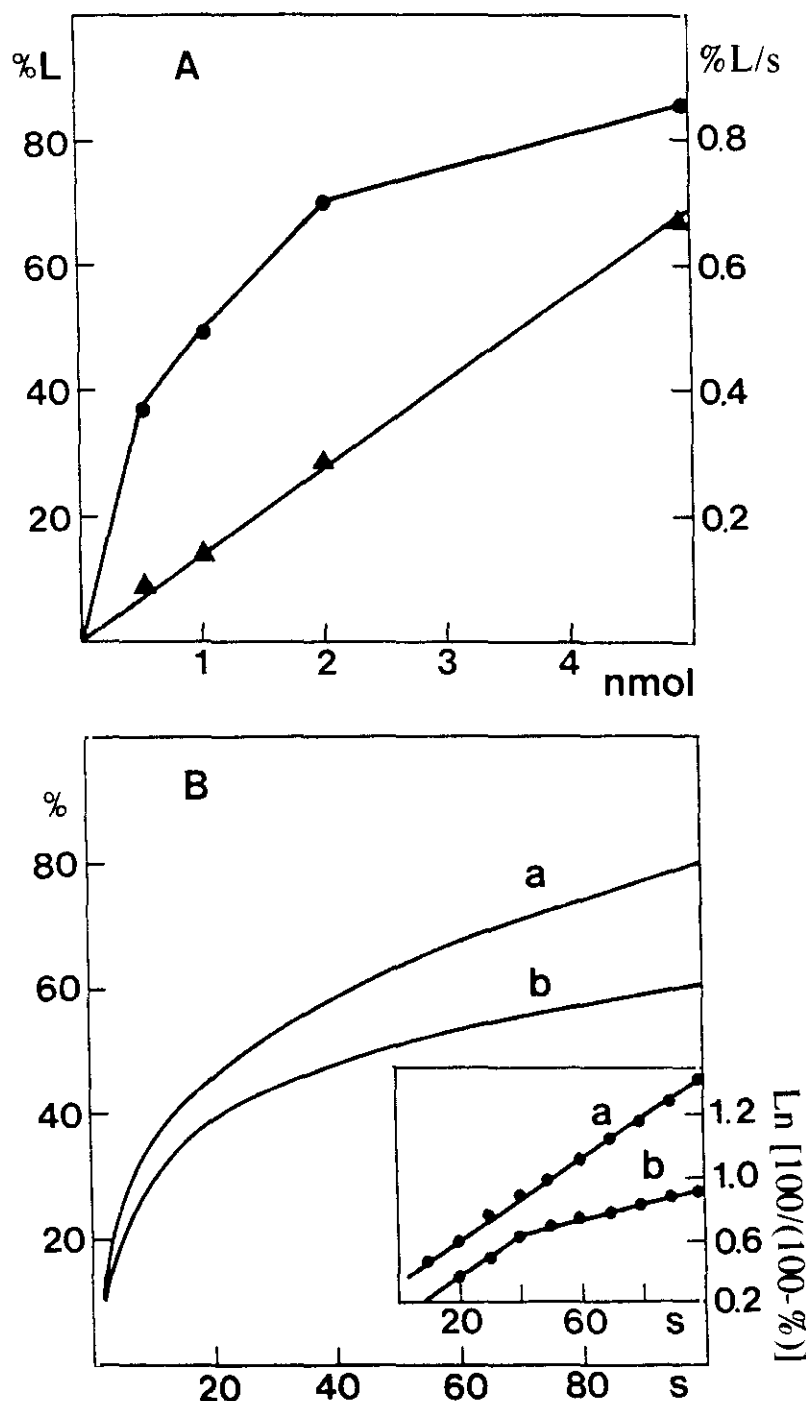
estructura secundaria compuesta por un 15%  $\alpha$ -hélice, 17% lámina  $\beta$  antiparalela, 17% giro  $\beta$  y 51% estructura irregular, de acuerdo al método de ajuste de Perczel *et al.* (1991).

Por lo tanto, el TFE aumenta el contenido de  $\alpha$ -hélice de la  $\alpha$ -SRC. Las semejanzas espectroscópicas existentes han de interpretarse como que tanto la estructura secundaria como el microentorno de los cromóforos de ambas proteínas son muy similares tras la adición de TFE. Por lo tanto, en condiciones en las que se promueven los puentes de hidrógeno intramoleculares, la  $\alpha$ -sarcina nativa y la  $\alpha$ -SRC adoptan una conformación similar, aunque esta última proteína carece de puentes disulfuro. El efecto del TFE al estabilizar los elementos de estructura secundaria ordenada parecería depender por lo tanto de la secuencia de aminoácidos; el disolvente induciría una estructura secundaria por la que la cadena polipeptídica posee determinada propensión (Sönnichsen *et al.*, 1992). Esto es lo que parece ocurrir con la  $\alpha$ -sarcina, por lo que ha de concluirse que los puentes disulfuro no suponen realmente una restricción en tal propensión.

### **La $\alpha$ -SRC interacciona con vesículas compuestas por fosfolípidos ácidos**

La  $\alpha$ -sarcina nativa interacciona con vesículas compuestas por fosfolípidos ácidos. Se ha procedido a comprobar si la  $\alpha$ -SRC posee tal capacidad. Cuando se añade  $\alpha$ -SRC a una dispersión de vesículas de DMPG se produce un aumento en la turbidez de la muestra debido a la agregación de las vesículas. La cinética de este proceso de agregación se ha estudiado midiendo la variación de la absorción de dicha muestra a 360 nm ( $\Delta A_{360 \text{ nm}}$ ). En la figura 32A se representa la variación del  $\Delta A_{360 \text{ nm}}$  frente a la concentración de  $\alpha$ -SRC. El efecto se satura a una relación molar aproximada de 0.04:1 proteína/fosfolípido. La  $\alpha$ -sarcina nativa produce un efecto similar y, bajo estas mismas condiciones la saturación se observa a una relación molar 0.02:1 proteína/fosfolípido (Gasset *et al.*, 1989). Cabe resaltar el hecho de que a las correspondientes relaciones de saturación el  $\Delta A_{360 \text{ nm}}$  producido por la  $\alpha$ -SRC es 1.5 veces mayor que el producido por la  $\alpha$ -sarcina nativa. Al igual que la proteína nativa, la  $\alpha$ -SRC no produce cambio alguno en la absorción de una muestra compuesta por vesículas de fosfolípidos neutros de DMPC.

La  $\alpha$ -SRC desestabiliza bicapas de DMPG promoviendo mezcla de lípidos entre diferentes vesículas de este fosfolípido, tal y como se detecta mediante el ensayo clásico de variación de transferencia de energía (Struck *et al.*, 1981) (figura 32B). El porcentaje de transferencia de energía disminuye a medida que aumenta la concentración de  $\alpha$ -SRC, observándose la saturación a una relación 0.01:1 proteína/fosfolípido. Este resultado es el mismo que el obtenido con la  $\alpha$ -sarcina nativa en estas mismas condiciones experimentales (Gasset *et al.*, 1990). Cuando se comparan las figuras 3A y 3B en términos de relación molar proteína/fosfolípido, puede concluirse que se produce agregación de vesículas fusionadas, pues los  $\Delta A_{360 \text{ nm}}$  no se han saturado a relaciones proteína/fosfolípido



**Figura 33. Mezcla de lípidos y liberación de contenidos acuosos de vesículas de PG de huevo inducido por  $\alpha$ -SRC.** (A) Liberación de contenidos acuosos de vesículas de PG de huevo inducida por  $\alpha$ -SRC, registrada como aumento en la emisión de fluorescencia de ANTS (véase parte experimental). Se representa la extensión de la liberación (●), expresada como porcentaje de liberación [(%)L], así como las velocidades iniciales del proceso (▲), expresadas como [(%)L/s, frente a la cantidad de  $\alpha$ -SRC presente en el ensayo (nmoles). Las vesículas se encontraban en Tris 10 mM, pH 7.5 conteniendo NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM a una concentración de 0.1 mg/ml. (B) Cinéticas de mezcla de lípido (a) y liberación de contenidos (b) de vesículas de PG de huevo (0.1 mg/ml) inducidos por  $\alpha$ -SRC (5 nmoles). Los valores se expresan como porcentajes de la variación máxima de cada ensayo (véase parte experimental). Recuadro: representación de los datos de la gráfica (B) de acuerdo con la expresión  $\ln[100/(100-\%)]$  frente a tiempo (s), siendo (%) los valores de la gráfica (B).

a las que la transferencia de energía ya lo ha hecho.

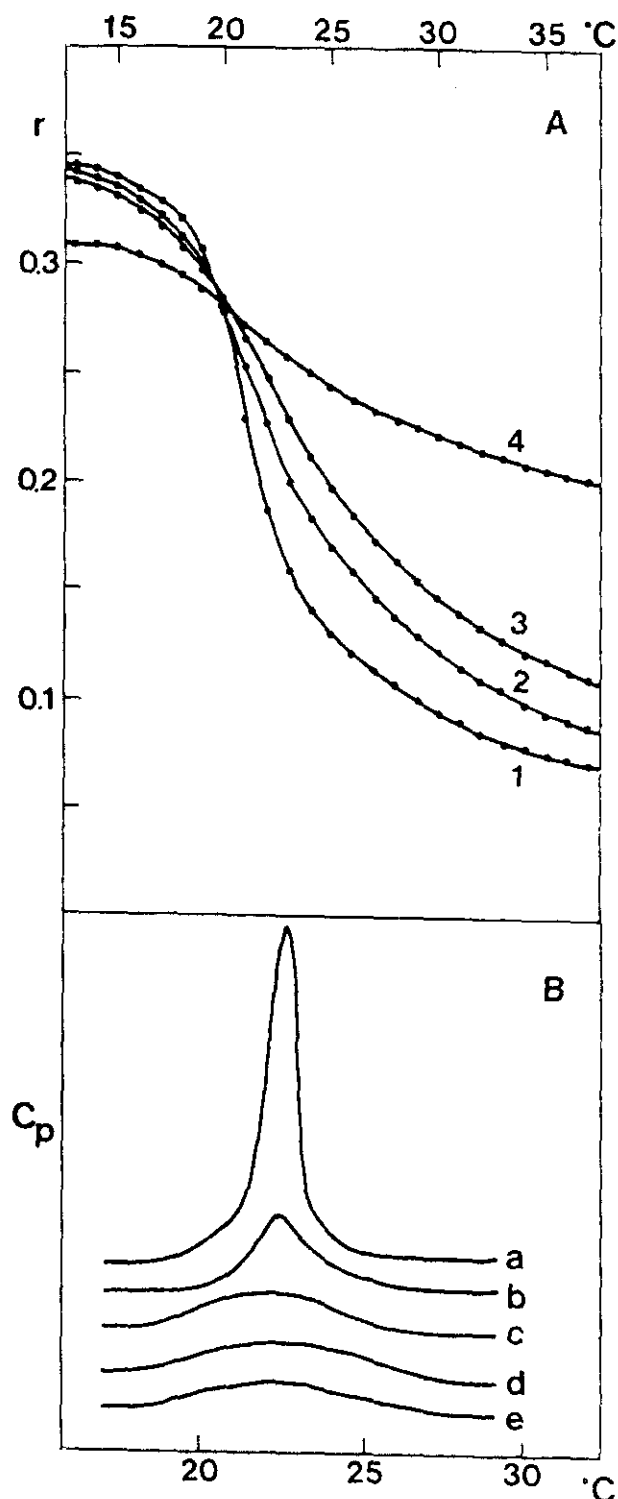
La  $\alpha$ -SRC produce liberación de contenidos acuosos de vesículas compuestas por PG de huevo, según se ha detectado empleando el ensayo del ANTS/DPX (Ellens *et al.*, 1985) (figura 33A). En nuestro sistema, el porcentaje de liberación de contenidos es directamente proporcional a la concentración de  $\alpha$ -SRC, requiriéndose al menos 10 min para completarse el proceso, a la menor concentración de proteína empleada. Considerando como 100 % de liberación la fluorescencia medida tras lisar las vesículas con Triton X-100 (1 % concentración final), el máximo valor de liberación de contenidos sería del 85 %. La velocidad inicial del proceso aumenta linealmente con la concentración de proteína en el intervalo de concentraciones estudiado.

La  $\alpha$ -SRC también produce mezcla de lípidos de vesículas compuestas por PG de huevo (figura 33B). Cuando se compara la cinética de este proceso con la de liberación de contenidos acuosos, se puede observar que este último proceso es, o bien coincidente en el tiempo al primero, o bien posterior. Es esperable observar un retraso de la liberación de contenidos con respecto a la mezcla de lípidos si la interacción transcurre a través de una primera etapa en la que se forman estructuras en las que se mantiene la integridad vesicular (no hay variaciones de permeabilidad de membrana). Las cinéticas de ambos procesos indican que tal retraso no existe (figura 33B). Si las cinéticas se comparan considerando  $\ln[100/(100-\%)]$  vs. tiempo (recuadro figura 33B), se puede concluir que la mezcla de lípidos es un proceso de primer orden, lo cual, a su vez, significa que la agregación de vesículas no es la etapa limitante del proceso global de interacción. Un análisis similar para las cinéticas de liberación de contenidos indica que la constante de velocidad del proceso disminuiría a medida que éste transcurre (recuadro figura 33B). De acuerdo con esto, la mezcla de lípidos promovida por la  $\alpha$ -SRC es un proceso que conlleva liberación de contenidos acuosos desde las primeras etapas, aunque una vez que se desarrolla la mezcla de lípidos, la liberación de contenidos se retarda (recuadro figura 33B).

El análisis de los efectos de una proteína sobre el comportamiento termotrópico de las vesículas proporciona información sobre la posible naturaleza de las interacciones proteína-vesícula. La implicación de componentes hidrofóbicos y/o electrostáticos en una interacción puede deducirse de este tipo de estudios. La  $\alpha$ -SRC modifica el comportamiento termotrópico de las vesículas de fosfolípidos ácidos, no observándose efecto alguno sobre vesículas de fosfolípidos neutros como fosfatidilcolina. La  $\alpha$ -SRC disminuye la amplitud de la transición de fase entre el estado gel y el estado líquido cristalino de vesículas de DMPG marcadas con la sonda DPH, de modo dependiente de la relación

proteína/lípido (figura 34A). La  $\alpha$ -SRC tiende a eliminar dicha transición de fase sin afectar significativamente al valor de la temperatura a la que ésta tiene lugar. Relaciones molares mayores que 10:1 (lípido/proteína) ya no modifican el perfil de la variación de anisotropía. Estos resultados sugieren que la  $\alpha$ -SRC induce una desorganización de las

**Figura 34. Efecto de la  $\alpha$ -SRC sobre la transición de fase de vesículas lipídicas.** (A) Variación de la anisotropía de fluorescencia de vesículas de DMPG-DPH tras la interacción con  $\alpha$ -SRC a las siguientes relaciones molares DMPG/ $\alpha$ -SRC: (1) DMPG sólo; (2) 100:1; (3) 50:1; (4) 10:1. Los estudios se realizaron en Mops 50 mM, pH 7.0 conteniendo NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM. La concentración de fosfolípido fue 80  $\mu$ g/ml, siendo 1:1000 la relación en peso DPH/DMPG. Los valores son los promedios de tres medidas independientes. (B) Efecto de la  $\alpha$ -SRC sobre la transición de fase de vesículas de DMPG estudiada mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los termogramas corresponden a las siguientes relaciones molares lípido/proteína: (a) DMPG solo; (b) 400:1; (c) 200:1; (d) 100:1 y (e) 50:1. La concentración de lípido fue de 0.3 mg/ml. Las muestras se sometieron a un ciclo previo de calentamiento-enfriamiento. Los perfiles mostrados se obtienen posteriormente a una velocidad de barrido de 30  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$ , no encontrándose diferencias con ciclos posteriores.



cadenas de acilo de los fosfolípidos, modificando su grado de movilidad, lo cual estaría de acuerdo con una penetración de la proteína en las bicapas.

El efecto de la  $\alpha$ -SRC sobre la transición térmica de las vesículas ha sido analizado también mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los resultados obtenidos con mezclas de DMPG y  $\alpha$ -SRC a diferentes relaciones proteína/lípido aparecen en la figura 34B. La proteína determina una disminución del valor de  $\Delta H$  (calculada a partir del área bajo la curva de capacidad calorífica) asociada a la transición de fase del fosfolípido. Asimismo, el aumento de la relación proteína/lípido supone también un aumento en la anchura de la banda que define la transición, de un modo similar al observado en las transiciones analizadas mediante estudios de polarización de fluorescencia de DPH. Estos resultados sugieren que la proteína ejerce una importante desorganización de la bicapa lipídica, impidiendo a un elevado porcentaje de moléculas de fosfolípido participar en la transición de fase. Un análisis de estos resultados en términos de la ecuación

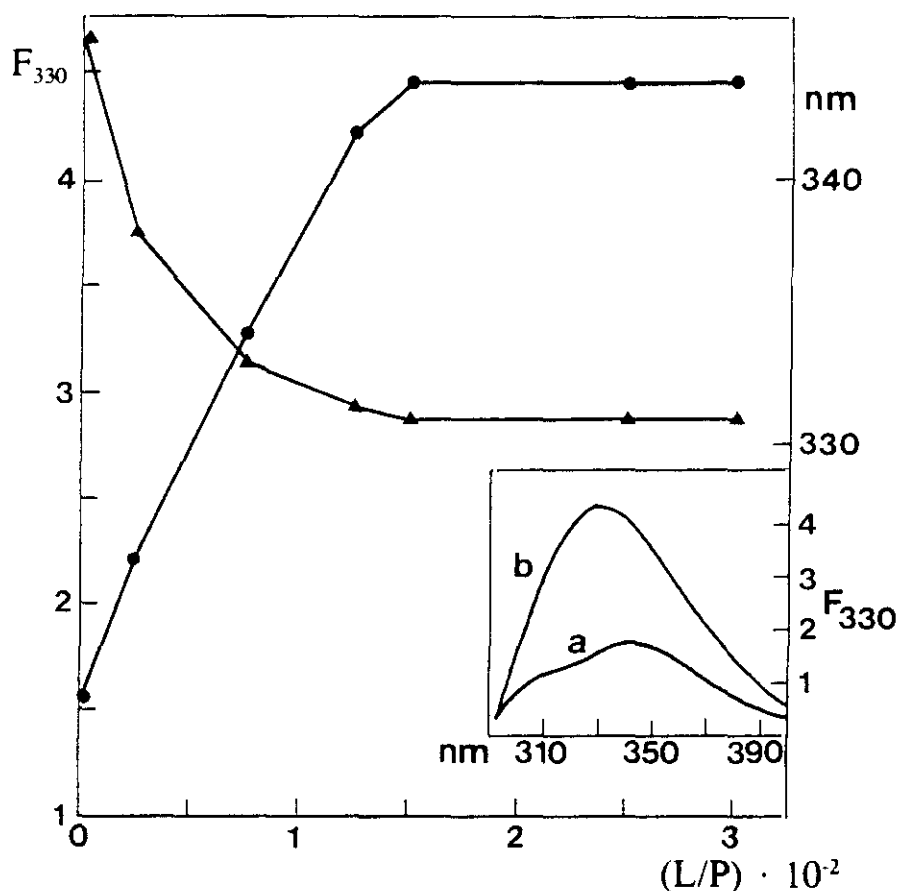
$$\Delta H/\Delta H_0 = 1 - N_a(P/L)$$

en donde  $\Delta H_0$  es el cambio de entalpía asociado a la transición del lípido en ausencia de la proteína y  $(P/L)$  es la relación proteína/lípido, proporciona un valor de  $N_a = 60$ , siendo este parámetro el número medio de moléculas de fosfolípido afectadas por una molécula de proteína. Resultados similares se han obtenido con vesículas de DMPS.

#### **Los residuos de triptófano de la $\alpha$ -SRC se transfieren a un medio de menor polaridad tras interaccionar con vesículas de fosfolípidos**

La emisión de fluorescencia del grupo indol de los residuos de triptófano es muy sensible a la constante dieléctrica del entorno en el que se encuentran. El espectro de emisión de fluorescencia de la  $\alpha$ -SRC se modifica significativamente tras la interacción con vesículas de fosfolípidos. La figura 35 muestra un resumen de los resultados obtenidos con vesículas de DMPG. La interacción de la  $\alpha$ -SRC con estas vesículas produce un desplazamiento hacia el azul en la posición del máximo de emisión de fluorescencia (ver recuadro de la figura 35), desplazándose éste desde los 345 nm hasta 330 nm. Asimismo, se observa un aumento en el rendimiento cuántico de la proteína, multiplicándose la intensidad de fluorescencia de la proteína por un factor de 3 tras la interacción. La saturación de estos cambios se produce a una relación lípido/proteína de 125:1. El aumento del rendimiento cuántico de la proteína podría deberse a una protección de los fluoróforos frente a los grupos polarizables responsables del apagamiento de la

fluorescencia de estos residuos. Estas observaciones se pueden interpretar en términos de una transferencia del grupo indol de los residuos de triptófano a un entorno de menor polaridad tras la interacción con vesículas lipídicas. Esta nueva localización de los grupos indol también puede deducirse de los resultados derivados del apagamiento de la fluorescencia de los mismos residuos de triptófano, llevado a cabo por antraceno incorporado en la bicapa. Esta molécula puede considerarse localizada en la región de las cadenas de acilo, según se puede derivar de su carácter hidrofóbico (Uemura *et al.*, 1983). El espectro de emisión de fluorescencia del grupo indol solapa con el de absorción del antraceno, por lo que entre ellos puede existir transferencia de energía (Uemura *et al.*, 1983). El antraceno incorporado en vesículas de DMPG apaga la emisión de fluorescencia de la  $\alpha$ -SRC, produciéndose un aumento simultáneo en la emisión a 400 nm (figura 36). La transferencia de energía entre ambos fluoróforos aumenta a medida que lo hace la



**Figura 35. Efecto de las vesículas de DMPG sobre la emisión de fluorescencia de  $\alpha$ -SRC.** Representación de la intensidad de fluorescencia a 330 nm para excitación a 275 nm (●) y de la longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia (▲) con respecto a la relación lipídico/proteína (L/P). Los resultados son los promedios de tres medidas independientes, empleando una concentración constante de proteína. Recuadro: espectros de emisión de fluorescencia de  $\alpha$ -SRC (a) y DMPG/ $\alpha$ -SRC a una relación 150:1 (b). Las muestras fueron preparadas en Mops 50 mM, pH 7.0, con NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM. En todas las medidas se emplearon polarizadores con el fin de evitar los efectos de la posible dispersión de luz.

relación antraceno/proteína, saturándose el valor de tal transferencia tanto con la relación DMPG/proteína como con la relación antraceno/proteína (figura 36A y 36B). La magnitud de la transferencia es de un orden similar al observado con la cardiotoxina II (Batenburg *et al.*, 1985), melitina (Batenburg *et al.*, 1987) o el péptido Boc-Trp-Phe-OET (Uemura *et al.*, 1983).

**La  $\alpha$ -sarcina nativa y la  $\alpha$ -SRC muestran diferentes conformaciones tras la interacción con bicapas lipídicas. Estudios de espectroscopía de infrarrojo.**

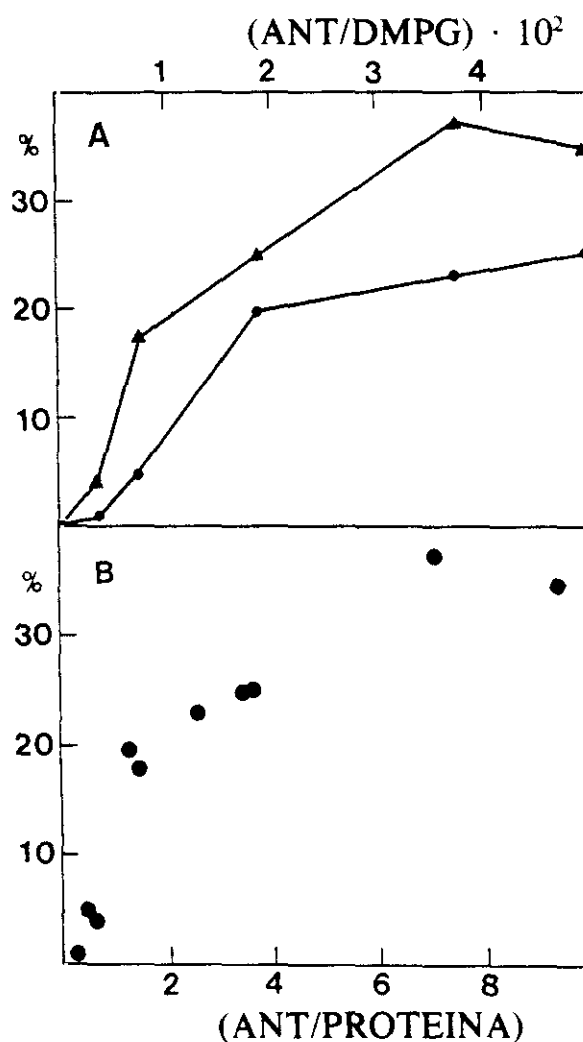
El efecto de las vesículas lipídicas sobre la estructura secundaria de la  $\alpha$ -SRC se ha examinado mediante FTIR ya que la turbidez de la mezcla  $\alpha$ -SRC-vesículas impide una caracterización estructural mediante técnicas de dicroísmo circular. La validez de la espectroscopía de infrarrojo para caracterizar la estructura secundaria de las proteínas está bien reconocida (Goormaghtigh y Ruyschaert, 1991). En la figura 37 aparece la banda amida I' del espectro de infrarrojo de la  $\alpha$ -SRC, en presencia y en ausencia de vesículas, tras desconvolución. Un posterior ajuste para determinar las bandas componentes del espectro no pudo realizarse de un modo fiable pues el resultado de la desconvolución del espectro de la  $\alpha$ -SRC no presentó máximos definidos. Un incremento en el factor de resolución o una disminución de la anchura de banda Lorentziana no hizo sino incrementar el carácter asimétrico del espectro sin conducir a una diferenciación de las bandas. Tras la interacción con vesículas, la  $\alpha$ -SRC sufre un cambio conformacional según se deriva del cambio en la banda amida I'. El espectro de diferencia puede observarse en la figura 37. Las bandas negativas dan cuenta de los elementos de estructura perdidos tras la interacción, mientras que los positivos darían cuenta de los ganados. De este modo, la  $\alpha$ -SRC en presencia de vesículas de DMPG tendría mayor contenido en  $\alpha$ -hélice y giros, mientras que perdería estructura  $\beta$ . Esta pérdida corrobora la presencia previa de este tipo de estructura en la  $\alpha$ -SRC libre, tal y como se deduce del espectro de CD. De acuerdo con medidas de FTIR la  $\alpha$ -sarcina nativa aumenta su contenido en  $\alpha$ -hélice tras interaccionar con vesículas (Gasset *et al.*, 1991b).

## DISCUSION

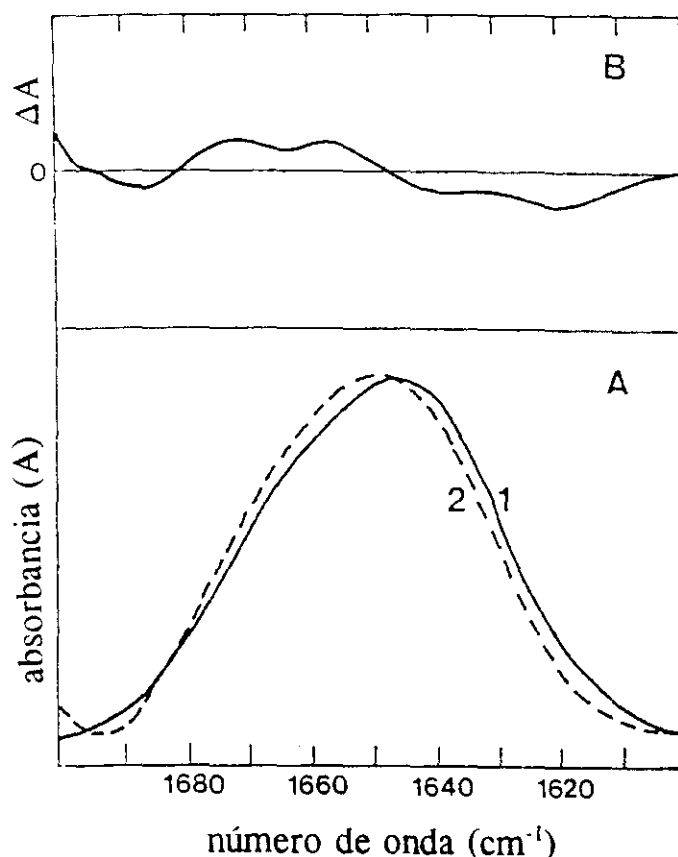
La interacción de la  $\alpha$ -sarcina con vesículas lipídicas viene caracterizada por una combinación de factores electrostáticos e hidrofóbicos (Gasset *et al.*, 1991a, 1991b). El componente electrostático de la interacción es fácilmente explicable en términos de una neutralización de cargas entre las cabezas polares de los fosfolípidos cargados negativa-



mente y residuos de carácter básico de la  $\alpha$ -sarcina. El componente hidrofóbico sin embargo, no se explica *a priori* fácilmente debido a que la proteína carece de regiones de secuencia de una hidrofobicidad significativa. En este sentido, el modelo predictivo de la conformación de la  $\alpha$ -sarcina predice la existencia de un núcleo hidrofóbico formado por cuatro cadenas  $\beta$ , potencialmente responsable de la interacción hidrofóbica. Ahora bien,



**Figura 36. Apagamiento de la emisión de fluorescencia de los residuos de triptófano de la  $\alpha$ -SRC por antraceno incorporado en vesículas de DMPG.** El efecto del antraceno (ANT) se evalúa considerando una eficacia aparente de transferencia de energía (%), definida como  $(\%) = [1 - (F/F_0)] \cdot 100$ , donde F y  $F_0$  son la intensidad de fluorescencia a 340 nm, para excitación a 295 nm, en presencia y ausencia de ANT, respectivamente. (A) Las medidas de (%) se realizaron tras incubación de una mezcla de  $\alpha$ -SRC (1.47  $\mu\text{M}$ ) y vesículas de DMPG-ANT durante 1 h a 37°C, a dos relaciones lípido/proteína: 188:1 ( $\blacktriangle$ ) y 70:1 ( $\bullet$ ). (B) Representación de eficacia aparente de transferencia de energía (%) frente a la relación molar ANT/ $\alpha$ -SRC.



**Figura 37. Estructura secundaria de la  $\alpha$ -SRC en presencia y ausencia de vesículas lipídicas.** (A) Región de la banda amida I' del espectro de FTIR de  $\alpha$ -SRC en ausencia (1) y presencia (2) de vesículas de DMPG a una relación molar lípido/proteína de 150:1. (B) espectro diferencia (espectro 2 menos espectro 1). La desconvolución de los espectros se hizo empleando un factor de aumento de resolución K de 2 y una anchura media de banda Lorentziana de  $30\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras se prepararon en ventanas de  $\text{CaF}_2$  mezclando  $10\text{ }\mu\text{l}$  de  $\alpha$ -SRC (5 mg/ml en d-tampón: Mops 50 mM, pH 7.0, con NaCl 0.1 M, EDTA 1 mM en  $\text{D}_2\text{O}$ ) y d-tampón o la correspondiente cantidad de DMPG en tampón. Las correcciones por el efectos isotópico sobre el pH no fueron consideradas. Las regiones de la banda amida I' correspondientes a los diferentes elementos de estructura secundaria considerados fueron:  $1662\text{-}1645\text{ cm}^{-1}$ ,  $\alpha$ -hélice;  $1689\text{-}1682$  y  $1637\text{-}1613$ , estructura  $\beta$ ;  $1644\text{-}1637$ , estructura no ordenada;  $1682\text{-}1662$ , giros  $\beta$  (Goormaghtigh *et al.*, 1990).

los efectos producidos por una proteína pueden deberse bien a su conformación nativa bien a la conformación inducida por el ligando tras la interacción. Es decir, las regiones de la  $\alpha$ -sarcina responsables de la interacción hidrofóbica (potencialmente el núcleo  $\beta$ ) pueden estar presentes en la forma nativa de la proteína o bien inducirse al interaccionar con bicapas. El hecho de que la  $\alpha$ -sarcina sufra cambios conformacionales al interaccionar con bicapas lipídicas (Gasset *et al.*, 1991b) no permite diferenciar estas dos posibilidades. Una forma de  $\alpha$ -sarcina desnaturalizada podría proporcionar información valiosa sobre este punto.

La  $\alpha$ -sarcina desnaturalizada térmicamente sufre un proceso de renaturalización parcial (Martínez del Pozo *et al.*, 1988), por lo que su empleo no resulta adecuado en este estudio. Asimismo, el uso de agentes desnaturalizantes que han de emplearse simultáneamente con las vesículas, se descarta por los efectos que éstos podrían causar sobre las membranas. La simple reducción de los puentes disulfuro de la  $\alpha$ -sarcina no se empleó tampoco, debido a que posibles reacciones de oxidación pudieran conducir a la renaturalización de la proteína. La reducción y carboxiamidometilación de la  $\alpha$ -sarcina determina una modificación química estable e irreversible en la proteína, por lo que se consideró adecuada. La iodoacetamida, al no introducir cambios en la carga neta de la proteína tras la modificación, se prefirió al iodoacetato, que introduce cargas negativas.

La caracterización espectroscópica de la  $\alpha$ -SRC muestra cambios en las bandas de absorción y emisión de los residuos de triptófano típicas de un polipéptido desnaturalizado. Esto queda confirmado por los resultados de dicroísmo circular, tanto en el UV-lejano como en el UV-próximo. De este mismo estudio se deriva que la  $\alpha$ -SRC retiene algunos elementos de estructura secundaria: giros y cadenas  $\beta$ . No obstante, este resultado no resulta sorprendente en el sentido de que numerosas proteínas desnaturalizadas conservan una fracción significativa de estructura secundaria (Montelione y Scheraga, 1989; Shortle, 1993).

La  $\alpha$ -SRC interacciona con vesículas de fosfolípidos ácidos, de un modo similar al de la  $\alpha$ -sarcina nativa. La agregación de vesículas observada se relaciona con la capacidad de la proteína para disminuir la repulsión electrostática entre las vesículas mediante una neutralización de cargas. El que se conserve la capacidad de agregación podría explicarse fácilmente considerando que la reducción y carboxiamidometilación de la  $\alpha$ -sarcina no introduce, previsiblemente, cambios en la carga neta de la proteína. Ahora bien, de este resultado ha de concluirse que dicha capacidad de agregación no es dependiente de la conformación nativa de la proteína. Asimismo, la  $\alpha$ -SRC no interacciona con vesículas de fosfolípidos neutros de fosfatidilcolina, aun cuando la desnaturalización de la proteína supone la exposición al disolvente acuoso de residuos hidrofóbicos. Esto significaría que tales residuos no pueden considerarse como la fuerza conductora de la interacción con vesículas, sino que como etapa previa a la interacción hidrofóbica hay otra de carácter electrostático que se convierte en un requisito previo inicial.

Al igual que la  $\alpha$ -sarcina nativa, la  $\alpha$ -SRC posee la capacidad de desestabilizar bicapas lipídicas. La  $\alpha$ -SRC produce mezcla de lípidos así como liberación de contenidos acuosos. Igualmente, la proteína disminuye la amplitud de la transición de fase del fosfolípido, según se deriva de estudios de calorimetría diferencial de barrido. Estos

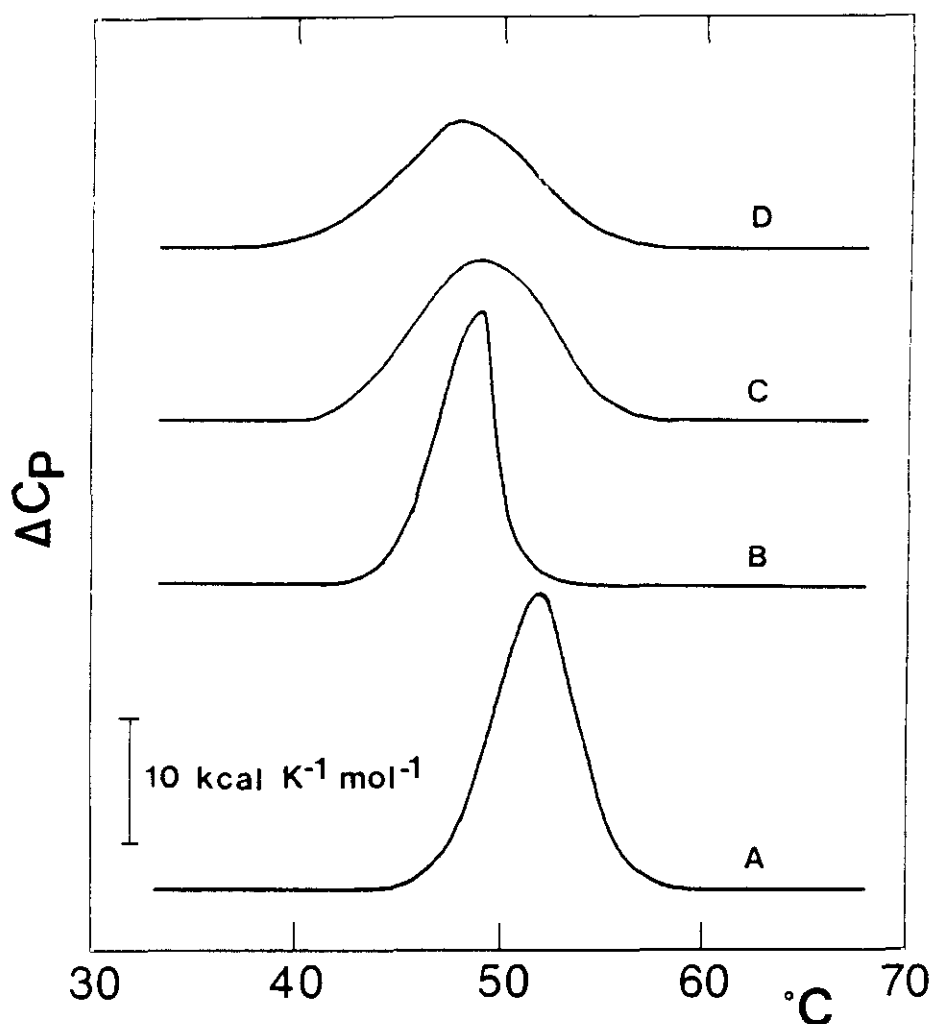
resultados, junto con el hecho de observarse transferencia de energía entre los residuos de triptófano y antraceno incorporado en las bicapas, indican un paso de la proteína al interior hidrofóbico. Por lo tanto, la  $\alpha$ -sarcina nativa y la  $\alpha$ -SRC interaccionan hidrofóbicamente con membranas aunque su conformación es diferente. En este sentido, el modelo estructural de la conformación de la  $\alpha$ -sarcina predice la existencia en la proteína nativa de un núcleo hidrofóbico formado por cinco cadenas  $\beta$ , que pudiera estar implicado en la interacción con membranas. La  $\alpha$ -SRC conserva elementos de estructura secundaria según se deriva de los resultados de CD y de FTIR. En concreto, el porcentaje de estructura  $\beta$  determinado resulta ser del 20%. Una hipótesis que puede manejarse en este sentido es que la  $\alpha$ -SRC conserva dicho núcleo, lo que la habilitaría para interaccionar hidrofóbicamente con membranas. Contrariamente a este razonamiento, no puede descartarse el hecho de que la interacción de la  $\alpha$ -SRC con membranas sea un proceso inespecífico típico de proteínas desnaturalizadas. En oposición a esta afirmación se podría decir que la  $\alpha$ -SRC es una proteína soluble y estable, en la que no se ha observado fenómenos de agregación, incluso a concentraciones elevadas. En este sentido, se ha comprobado que numerosas proteínas hidrosolubles interaccionan con vesículas lipídicas a pH ácido, condiciones en las que dichas proteínas sufren una exposición de residuos hidrofóbicos. En este caso sin embargo, dichas proteínas agregan intensamente en ausencia de vesículas (Hong *et al.*, 1985; Kim y Kim, 1986; Harter *et al.*, 1988).

En resumen, los resultados obtenidos indicarían que no se requiere la conformación nativa de la  $\alpha$ -sarcina para que existan interacciones electrostáticas con vesículas modelo, ya que la  $\alpha$ -SRC posee la capacidad de interaccionar electrostática e hidrofóbicamente con membranas. Los elementos estructurales que posee esta proteína modificada la capacitarían para ello; dichos elementos de estructura secundaria determinados serían estructura  $\beta$  y giros.

## 6. DESNATURALIZACION TERMICA DE LA $\alpha$ -SARCINA: DESESTABILIZACION DE LA PROTEINA INDUCIDA POR LA UNION A MEMBRANAS

### Estudios de la desnaturalización de la $\alpha$ -sarcina mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la figura 38 aparece un resumen de las curvas de DSC obtenidas para la desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina y para la desnaturalización de diferentes complejos  $\alpha$ -sarcina-vesículas de fosfolípido, empleando una velocidad de barrido de  $0.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . El termograma correspondiente a la proteína sola exhibe un único pico altamente simétrico centrado en torno a los  $52.6^{\circ}\text{C}$ , temperatura que corresponde a la de desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina. La temperatura del máximo de capacidad calorífica,  $T_m$ , es dependiente de la velocidad de barrido; de hecho, la  $T_m$  determinada a una velocidad de barrido de  $1.0^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  es  $1.5^{\circ}\text{C}$  mayor que la determinada anteriormente. La dependencia de la  $T_m$  con la velocidad de barrido sugiere que el proceso estudiado podría estar controlado cinéticamente (Freire *et al.*, 1990). Sin embargo, el estudio se ha llevado a cabo a una velocidad baja ( $0.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) con fines comparativos. La desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina se caracteriza por un cambio de entalpía aparente ( $\Delta H_{\text{cal}}$ ) de  $136 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  (tabla II), sin considerar la corrección por la entalpía de ionización del tampón. Este valor normalizado por masa de proteína ( $8 \text{ cal}\cdot\text{g}^{-1}$ ) es similar a los obtenidos para otras proteínas hidrosolubles (Murphy *et al.*, 1992; Haltia *et al.*, 1994) lo cual sugiere que la desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina afecta a la totalidad de la molécula. El cambio de capacidad calorífica estimado (Murphy y Freire, 1992) asociado a la denaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina es  $1380 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ , por lo que la desnaturalización térmica de la proteína viene probablemente acompañada de una hidratación de gran parte de la proteína. La relación entre la entalpía de van't Hoff,  $\Delta H_{\text{vH}}$ , y la entalpía calorimétrica  $\Delta H_{\text{cal}}$  ( $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$ ) es 1.1, lo cual sugiere que la desnaturalización de la proteína puede describirse como una transición entre dos estados (Privalov, 1979; Sturtevant, 1987). La reversibilidad del proceso se ha estudiado mediante un nuevo ciclo de calentamiento tras enfriar y estabilizar la muestra después del primer ciclo. El porcentaje de  $\Delta H_{\text{cal}}$  recuperado es función tanto de la temperatura máxima alcanzada en el primer ciclo como del tiempo de estabilización previo al segundo ciclo. El porcentaje de  $\Delta H_{\text{cal}}$  recuperado es un 70% del inicial cuando la temperatura máxima es  $70^{\circ}\text{C}$  y la muestra se mantiene 2 h a  $10^{\circ}\text{C}$  antes del segundo ciclo. No se han empleado temperaturas superiores a  $70^{\circ}\text{C}$  por la posible inducción de modificaciones covalentes en la molécula de proteína (Sturtevant, 1987; Freire *et al.*, 1990).



**Figura 38.** Termogramas de la  $\alpha$ -sarcina en disolución y unida a diferentes tipos de vesículas de PG. Representación del exceso de capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ) frente a la temperatura, de la  $\alpha$ -sarcina en disolución (A) y unida a vesículas de DMPG (B), DOPG (C) y de PG de huevo (D), a una relación molar lípido/proteína de 200:1. La barra representa una capacidad calorífica de  $10 \text{ kcal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ . La velocidad de barrido fue de  $30^\circ\text{C} \cdot \text{h}^{-1}$ . Los experimentos se han llevado a cabo a una concentración constante de proteína (1 mg/ml) en tampón Mops 50 mM, pH 7.0, con NaCl 0.1 M y EDTA 1mM.

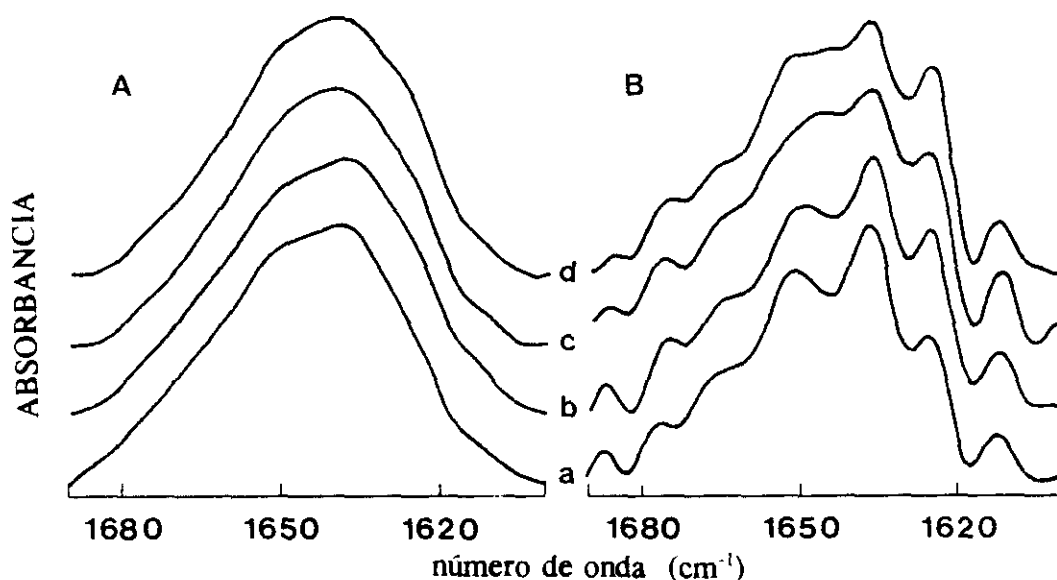
El estudio de los efectos del PG sobre la desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina se ha estudiado empleando mezclas proteína-lípido a una relación molar (1:200). Considerando que la relación proteína/lípido saturante es (1:50) (Gasset *et al.*, 1989), en las condiciones anteriores toda la proteína se debe encontrar unida, por lo que las variaciones observadas en los termogramas no estarán relacionadas con diferentes proporciones entre formas libres y unidas de  $\alpha$ -sarcina. Este análisis calorimétrico es, sin

embargo, complejo debido a la formación de grandes agregados de vesículas y complejos de fusión inducidos por  $\alpha$ -sarcina (Gasset *et al.*, 1989, 1990). En las condiciones empleadas para las medidas calorimétricas la precipitación de los complejos se produce en pocos segundos, por lo que la interacción  $\alpha$ -sarcina-lípido se realizó en la propia célula calorimétrica. Este tratamiento no debiera afectar a la desnaturalización de la proteína ya que la temperatura de incubación es de 37°C, muy por debajo de la  $T_m$  determinada anteriormente. Sin embargo, este procedimiento supone el manejo de un sistema con una interfase sólido-líquido en la célula que puede constituir una fuente de error en las medidas de los parámetros termodinámicos considerados.

En la figura 38 aparecen solamente las regiones de temperaturas elevadas de los termogramas correspondientes a los complejos  $\alpha$ -sarcina-PG. A temperaturas inferiores a 30°C los termogramas están dominados por la transición termotrópica del lípido (Gasset *et al.*, 1991). Se puede observar que el DMPG modifica el termograma de desnaturalización de la  $\alpha$ -sarcina (figura 38B), apareciendo un único pico asimétrico caracterizado por una  $T_m$  de 49.1°C. El valor calculado de  $\Delta H_{cal}$  es 77 kcal·mol<sup>-1</sup>, sensiblemente inferior al obtenido para la proteína en disolución (tabla II). Este resultado sugiere que la desnaturalización térmica de la proteína unida a vesículas no afecta a la totalidad de la molécula. La estabilidad de una proteína se suele definir como la diferencia de energía libre entre la forma nativa y la forma desnaturalizada. Por lo tanto, la disminución tanto de la  $T_m$  como del incremento de entalpía calorimétrica asociado a la desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina, es una evidencia de la desestabilización de la forma unida a membranas de la  $\alpha$ -sarcina, comparada con la forma libre, no unida.

El valor de  $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$  calculado para la transición anterior es de 2.7, hecho que, junto con la agudeza y carácter asimétrico del pico endotérmico del termograma, sugieren que el proceso no puede ser descrito como una transición entre dos estados, pudiendo ocurrir procesos de agregación de la proteína, ya sea entre estados plegados o desnaturalizados, o bien, entre ambas formas (Sturtevant, 1987). En este sentido, el análisis cinético de las primeras etapas del proceso de agregación de vesículas inducida por  $\alpha$ -sarcina revela la implicación de interacciones proteína-proteína en la formación de tales agregados (véase Estudio cinético de la agregación y mezcla de lípidos de vesículas de PG y PS producidas por  $\alpha$ -sarcina: medidas de dispersión de luz mediante técnicas de flujo detenido y medidas de transferencia de energía de fluorescencia). Hay, sin embargo, otras posibles explicaciones para el hecho de que  $\Delta H_{vH} > \Delta H_{cal}$  en el proceso de desnaturalización térmica de una proteína, como pueden ser, la existencia de intermedios en la desnaturalización del tipo "molten globule" (Xie *et al.*, 1991), o errores en la determinación de la concentración de proteína (Hu *et al.*, 1992). Esta última posibilidad puede descartarse en

nuestro caso ya que la concentración de  $\alpha$ -sarcina se determina rutinariamente mediante análisis de aminoácidos y por medidas espectroscópicas. Por otro lado, hasta hoy día no hay ningún indicio sobre la existencia de un intermedio "molten globule" en el plegamiento de la  $\alpha$ -sarcina. La existencia de un estado estable tras la desnaturalización de la proteína (Privalov y Potekhin, 1986) o una situación experimental en condiciones de no equilibrio (Freire y Biltonen, 1978), pueden también explicar una desviación del comportamiento definido por una transición entre dos estados. Otra posible explicación de este comportamiento puede derivarse de la existencia de diferentes formas de  $\alpha$ -sarcina unida a membrana; de hecho se observa un comportamiento dual cuando se consideran otros tipos de PG. Así, el termograma de la  $\alpha$ -sarcina unida a vesículas de DOPG (a una relación molar proteína/lípido de 1:200), viene caracterizado por una  $T_m$  y por un  $\Delta H_{cal}$  menores que los de la  $\alpha$ -sarcina en disolución, así como por un ensanchamiento



**Figura 39. Espectros de FTIR de la  $\alpha$ -sarcina en disolución y unida a diferentes tipos de vesículas de PG.** (A) Espectros de FTIR de la  $\alpha$ -sarcina libre en disolución (a), y unida a DMPG (b), DOPG (c) y PG de huevo (d) a una relación molar lípido/proteína de 150:1. (B) Los mismos espectros tras desconvolución de Fourier empleando una anchura de banda Lorentziana de 30 cm<sup>-1</sup> y un factor de aumento de resolución de 1.8. Los espectros se han realizado a 37°C y en Mops 50 mM, pD 7.0, con NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM.



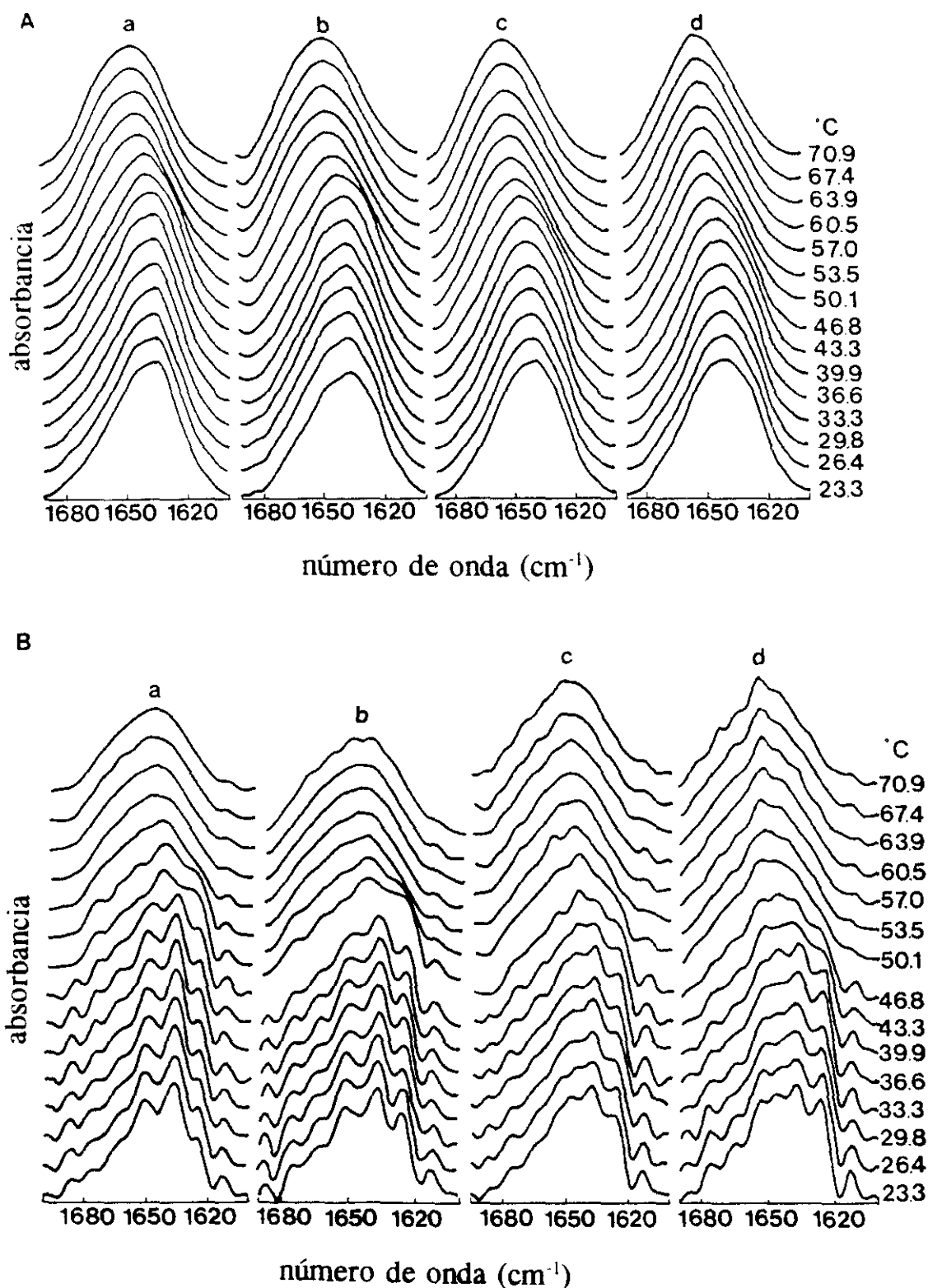
pronunciado del pico endotérmico de desnaturalización (figura 38C). Los valores de los parámetros termodinámicos aparecen en la tabla II. La relación  $\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal}$  tiene un valor de 1.0, que puede interpretarse como reflejo de una desnaturalización térmica descrita como una transición entre dos estados. Sin embargo, la desconvolución del perfil del exceso de capacidad calorífica muestra la existencia de al menos dos picos endotérmicos, y por lo tanto el proceso no puede aproximarse al modelo anterior. El análisis de los parámetros termodinámicos individuales no se ha llevado a cabo ya que la determinación de la línea base de una transición de esta anchura de banda resulta poco exacta.

Las vesículas formadas por PG de huevo también producen una disminución en los valores de  $T_m$  y de  $\Delta H_{cal}$  asociados a la desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina. Los valores de los parámetros termodinámicos del termograma de los complejos  $\alpha$ -sarcina-PG (figura 38D) aparecen en la tabla II. El valor de  $\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal}$  es 1.2, aunque la desconvolución del perfil térmico muestra asimismo dos picos, al igual que con DOPG. Finalmente, nuevos ciclos de calentamiento de los diferentes complejos  $\alpha$ -sarcina-lípido revelan cambios en los perfiles de capacidad calorífica. En este sentido, cabe decir que la  $\alpha$ -sarcina químicamente modificada y desnaturalizada interacciona con bicapas lipídicas (véase Caracterización espectroscópica de la  $\alpha$ -sarcina reducida y carboxiamidometilada. Análisis de los requerimientos estructurales para la interacción hidrofóbica con bicapas lipídicas). Por lo tanto, la  $\alpha$ -sarcina desnaturalizada térmicamente podría también interaccionar con lípidos y verse, por consiguiente, alterado el proceso de renaturalización.

De acuerdo con los datos termodinámicos obtenidos, y aunque existen diferencias entre los efectos producidos por los diferentes tipos de fosfatidilglicerol, se puede concluir que la  $\alpha$ -sarcina unida a vesículas lipídicas se ve desestabilizada, ya que tanto el valor de  $T_m$  como el de  $\Delta H_{cal}$  asociados a su transición térmica se ven disminuidos.

### **Estudios de la desnaturalización térmica de la $\alpha$ -sarcina mediante espectroscopía de infrarrojo**

La desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina se ha estudiado también mediante espectroscopía de infrarrojos. La frecuencia exacta de la vibración que origina la banda amida I en los espectros de infrarrojo depende de la naturaleza de los puentes de hidrógeno en los que intervienen los grupos  $C=O$  y  $NH$ , lo cual a su vez, está determinado por la estructura secundaria de la cadena polipeptídica (Arrondo *et al.*, 1993; Surewicz *et al.*, 1993). De este modo, hemos registrado la variación con la temperatura de la banda amida I' con la finalidad de analizar los cambios que se producen en la estructura



**Figura 40. Dependencia con la temperatura de los espectros de FTIR de la  $\alpha$ -sarcosina libre y unida a diferentes tipos de vesículas de PG. (a) Espectros correspondientes a la  $\alpha$ -sarcosina libre; (b,c,d) espectros correspondientes a  $\alpha$ -sarcosina unida a DMPG, DOPG y PG de huevo, respectivamente a una relación molar lípido/péptido de 150:1. (A) espectros originales; (B) espectros resueltos por desconvolución empleando las mismas condiciones que aparecen en la figura 39. Los espectros se han realizado a 37°C en Mops 50 mM, pD 7.0, con NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM.**

secundaria de la  $\alpha$ -sarcina a consecuencia de su desnaturalización térmica (figura 39). Esta banda es ligeramente diferente que la obtenida mediante ATR-FTIR (espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier de reflexión total atenuada) (Gasset *et al.*, 1991). Esta diferencia es probablemente debida a un intercambio parcial HxD (hidrógeno por deuterio). De hecho, hemos observado que dicho intercambio se completa a las 2 h cuando se hidrata una película seca de proteína (Gasset *et al.*, 1991), mientras que en disolución permanece una banda amida II residual incluso a 48 h de intercambio HxD (la relación de intensidades entre la banda amida II y la banda amida I es 0.21 para la  $\alpha$ -sarcina). Este intercambio parcial explicaría asimismo la aparición de un hombro que se observa a 1655  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro de FTIR de la  $\alpha$ -sarcina en disolución (figura 39A) y que no aparece en el espectro de ATR-FTIR (Gasset *et al.*, 1991).

La desconvolución del espectro de la  $\alpha$ -sarcina (figura 39B) revela la presencia de siete bandas en la región amida I'. La banda débil a 1612  $\text{cm}^{-1}$  se puede atribuir a las vibraciones de las cadenas laterales de los residuos de tirosina y arginina (Chirgadze *et al.*, 1975). La banda que aparece a 1626  $\text{cm}^{-1}$  puede representar estructuras  $\beta$  de baja frecuencia (Cabiaux *et al.*, 1989), mientras que las bandas a 1637, 1652 y 1667  $\text{cm}^{-1}$ , representarían estructura  $\beta$ ,  $\alpha$ -hélice y giros, respectivamente. Las bandas débiles a 1677 y 1687  $\text{cm}^{-1}$  serían vibraciones en fase de los grupos amida implicados en estructuras  $\beta$  (Surewicz *et al.*, 1990), aunque también pueden originarse a partir de giros (Surewicz y Mantsch, 1988).

La banda amida I' de la  $\alpha$ -sarcina se ve modificada tras la unión de la proteína a vesículas de fosfatidilglicerol (figura 39). Las principales diferencias se relacionan con las bandas a 1626  $\text{cm}^{-1}$  y 1643  $\text{cm}^{-1}$ ; la intensidad de ambas aumenta tras la interacción. Estos efectos son más pronunciados para DOPG y PG de huevo que para DMPG (figura 39). En presencia de estas vesículas lipídicas, la relación entre las bandas amida II y amida I' varía entre 0.15 y 0.17, indicando un aumento en el intercambio hidrógeno-deuterio en comparación con la proteína en disolución. Este aumento de accesibilidad al intercambio indica una perturbación en la estructura nativa de la  $\alpha$ -sarcina, resultante de la interacción con membranas.

El estudio de la dependencia con la temperatura de las bandas amida I puede aportar información útil acerca de la estabilidad térmica y del mecanismo de desnaturalización de las proteínas (Surewicz *et al.*, 1987; Arrondo *et al.*, 1988). Los espectros de infrarrojo de la  $\alpha$ -sarcina libre en disolución y unida a membranas, a diferentes temperaturas aparece en la figura 40. El perfil de la banda amida I' de la  $\alpha$ -sarcina libre permanece invariable entre los 20°C y los 43 °C (figura 40A, espectro a), indicando que

en este intervalo de temperaturas la proteína mantiene la estructura nativa. Un aumento posterior de la temperatura, en el intervalo comprendido entre los 47°C y 57°C, produce cambios en la forma inicial de los espectros, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos mediante DSC. Es de resaltar el hecho de que de la desconvolución de los espectros se deduce que la banda a 1626 cm<sup>-1</sup>, correspondiente a estructuras  $\beta$  de baja frecuencia, desaparece progresivamente (figura 40B). Es más, los espectros de la  $\alpha$ -sarcina tras sufrir la transición térmica, son diferentes para cada tipo de lípido (figura 40B). Para la  $\alpha$ -sarcina en disolución se observa una banda amida I' asimétrica, con un máximo a 1648 cm<sup>-1</sup> y un hombro a 1668 cm<sup>-1</sup>. Sin embargo, los espectros de la  $\alpha$ -sarcina en forma de complejo con los diferentes tipos de PG muestran mayor simetría y, tras la desconvolución aparece una banda diferenciada a los 1655 cm<sup>-1</sup>, característica de  $\alpha$ -hélices. Todos los métodos empleados para determinar las contribuciones de los diferentes elementos de estructura secundaria a partir de los espectros de FTIR se basan en el conocimiento de la posición y anchura de las bandas individuales. En este sentido, hemos observado que: i) los espectros de FTIR de la  $\alpha$ -sarcina desnaturalizada térmicamente son anchos, englobando la región de giros-hélice-estructura irregular; ii) la desconvolución de estos espectros no proporciona un estrechamiento de las bandas, incluso empleando un factor de aumento de resolución,  $K = 2.4$ ; y iii) el contenido en  $\alpha$ -hélice se puede sobreestimar (para la  $\alpha$ -sarcina reducida y carboxiamidometilada se deduce un contenido en  $\alpha$ -hélice mucho mayor que el determinado mediante dicroísmo circular). Por lo tanto, se ha evitado cualquier tratamiento matemático de los espectros. Debe resaltarse, sin embargo, que los lípidos podrían permitir conservar elementos helicoidales en la  $\alpha$ -sarcina desnaturalizada térmicamente, ya que se observan bandas a 1655 cm<sup>-1</sup> en los espectros analizados por desconvolución. Algunos autores han intentado ajustar los espectros de FTIR de proteínas desnaturalizadas térmicamente, encontrando estructuras secundarias remanentes. Así, Fabian *et al.* (1993) y Seshadri *et al.* (1994) han concluido la existencia de elementos de estructura secundaria remanente en la RNasa T1 y RNasa A, respectivamente.

La  $\alpha$ -sarcina desnaturalizada térmicamente exhibe una mayor accesibilidad al intercambio hidrógeno por deuterio (la relación entre las bandas amida II y amida I' es 0.14 y 0.21 para la proteína desnaturalizada y nativa, respectivamente). Así, la proteína unida a bicapas a una temperatura inferior a la  $T_m$  solamente muestra un ligeramente menor intercambio HxD (la relación entre las bandas amida II y amida I' se encuentra entre 0.15-0.17) que el mostrado por la proteína desnaturalizada. Un aumento de la accesibilidad al intercambio HxD se observa también para la proteína desnaturalizada unida a membranas. La relación entre las bandas amida II y amida I' es 0.09, 0.03 y 0.03 para la proteína desnaturalizada unida a DMPG, DOPG y PG de huevo, respectivamente.

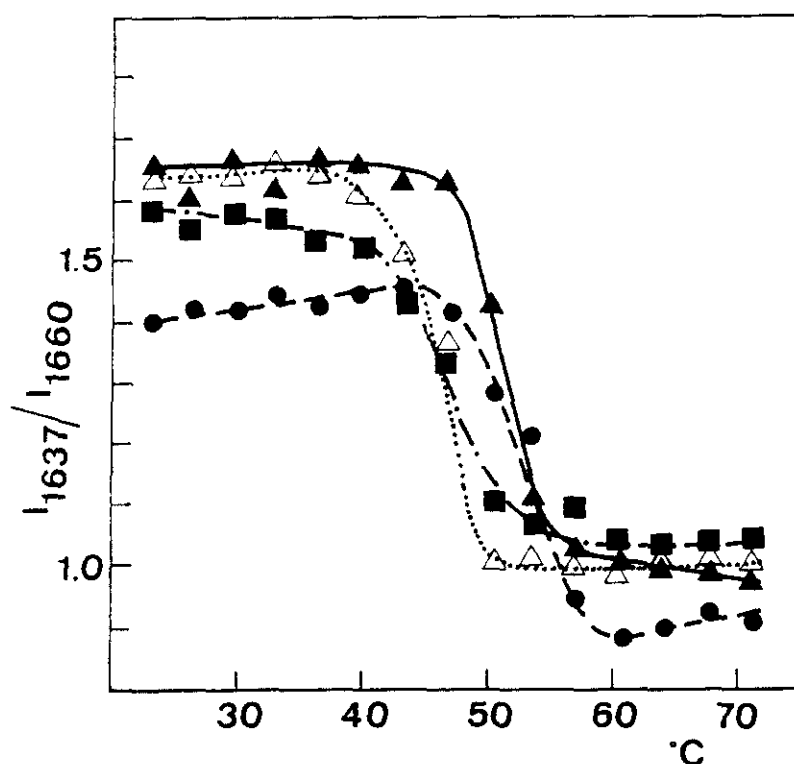


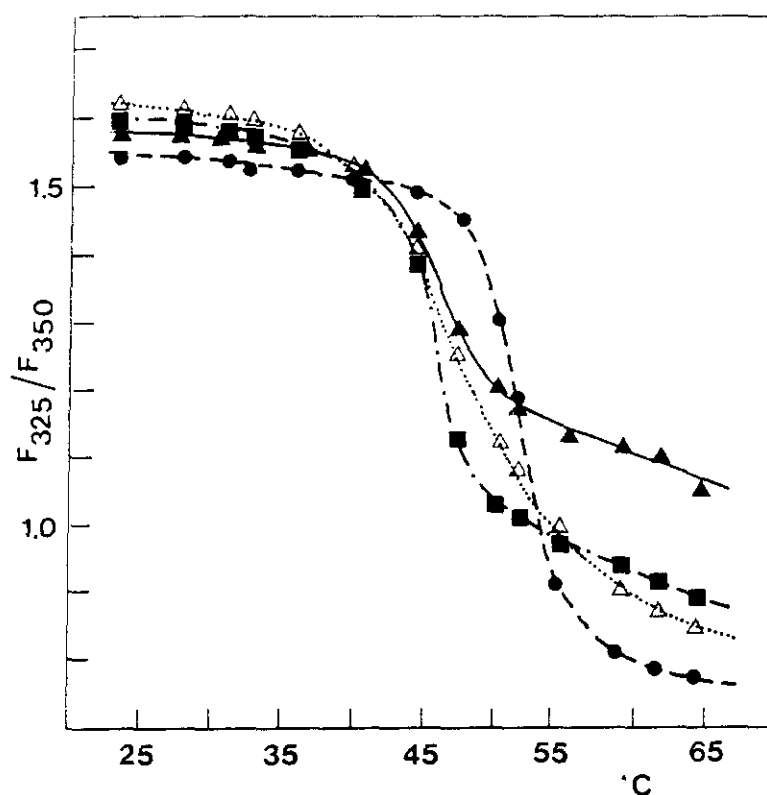
Figura 41. Variación de la relación de intensidades a  $1637\text{ cm}^{-1}$  y  $1660\text{ cm}^{-1}$  con la temperatura. Representación de la relación ( $I_{1637}/I_{1660}$ ), calculada a partir de los espectros de la figura 40 frente a la temperatura, para la  $\alpha$ -sarcina en disolución (●), o unida a DMPG (▲), a DOPG (Δ) y PG de huevo (■).

Un método empírico para seguir la desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina es el análisis de la relación de intensidades a  $1637$  y  $1660\text{ cm}^{-1}$  ( $I_{1637}/I_{1660}$ ). Los resultados obtenidos para la variación de este parámetro con la temperatura, tanto para la  $\alpha$ -sarcina libre como unida a los diferentes PG, se resumen en la figura 41. La temperatura a la que se produce el 50% de la transición térmica de la  $\alpha$ -sarcina libre es  $52.7^{\circ}\text{C}$ , valor que disminuye en presencia de las diferentes vesículas:  $51.3^{\circ}\text{C}$ ,  $45.9^{\circ}\text{C}$  y  $47.3^{\circ}\text{C}$  para los complejos con DMPG, DOPG y PG de huevo, respectivamente. Estos valores de temperatura están de acuerdo con los determinados mediante medidas de DSC. Las curvas de la figura 41 se pueden emplear para calcular la fracción de moléculas desnaturalizadas

para cada temperatura, que a su vez permiten determinar una constante de equilibrio aparente para el proceso de desnaturalización. Tal constante puede posteriormente emplearse para determinar el incremento de entalpía aparente asociado a la transición térmica a partir de las correspondientes representaciones de van't Hoff. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante los estudios de DSC, la desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina en presencia de vesículas lipídicas no puede ajustarse a una transición entre dos estados. Por lo tanto, en estos casos el parámetro calculado a partir de las representaciones de van't Hoff daría idea solamente de la cooperatividad de la transición y no la variación de entalpía asociada al proceso.

### **Estudios de la desnaturalización térmica de la $\alpha$ -sarcina mediante espectroscopía de fluorescencia**

La emisión de fluorescencia de los fluoróforos de una proteína está condicionada por las características de su microentorno, que viene a su vez determinado por la estructura terciaria de la proteína. El espectro de emisión de fluorescencia de la  $\alpha$ -sarcina viene dominado por la contribución de sus dos residuos de triptófano que se encuentran localizados en un entorno hidrofóbico (el máximo de emisión se centra en torno a los 330 nm, para una longitud de onda de excitación de 275 nm y 295 nm). Se ha observado que la adición de vesículas de PG promueve un aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia (Gasset *et al.*, 1991); por lo tanto, la desnaturalización de la  $\alpha$ -sarcina libre o unida a vesículas puede estudiarse mediante espectroscopía de fluorescencia. La desnaturalización térmica de la proteína viene acompañada de un desplazamiento hacia el rojo del máximo de emisión de los triptófanos (desde los 330 nm hasta los 345 nm), así como por una disminución en el rendimiento cuántico de estos residuos. De este modo, la relación entre las intensidades de fluorescencia a 325 nm y 350 nm, para una excitación de 295 nm, es un parámetro empírico que puede emplearse para seguir la desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina. La variación de este parámetro con la temperatura daría cuenta de cambios a nivel de la estructura terciaria de la proteína (microentorno de los residuos de triptófano) tras la desnaturalización de la proteína. En la figura 42 aparece un resumen de los resultados obtenidos para la  $\alpha$ -sarcina libre en disolución, y para la  $\alpha$ -sarcina unida a los diferentes tipos de PG. La temperatura a la que tiene lugar el 50% de la transición térmica para la  $\alpha$ -sarcina en disolución es 52°C, mientras que disminuye hasta 46.5°C, 46.5°C y 45°C para los complejos con DMPG, DOPG y PG de huevo, respectivamente, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos mediante DSC y FTIR.



**Figura 42. Variación de la relación de intensidades de fluorescencia  $F_{325}/F_{350}$  con la temperatura.** Representación de la relación  $F_{325}/F_{350}$ , para excitación a 295 nm con la temperatura, para la  $\alpha$ -sarcina en disolución ( $\bullet$ ), unida a DMPG ( $\blacktriangle$ ), a DOPG ( $\triangle$ ) y PG de huevo ( $\blacksquare$ ). la relación molar lípido/péptido es de 125:1. Los experimentos se han llevado a cabo en Mops 50 mM, pH 7.0 con NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM.

## DISCUSION

Las tres metodologías empleadas para estudiar la desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina, DSC, FTIR y espectroscopía de fluorescencia, permiten obtener información del proceso a nivel de la proteína completa, a nivel de la estructura secundaria y terciaria, respectivamente.

A pH neutro y a una concentración 0.1 M de NaCl, el proceso de desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina puede describirse como una transición entre dos estados controlada

TABLA II. Parámetros termodinámicos asociados a la desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina y de diversos complejos  $\alpha$ -sarcina-fosfatidilglicerol (relación molar 200:1). La velocidad de barrido fue de  $30^{\circ}\text{C h}^{-1}$

SISTEMA	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) <sup>a</sup>	$\Delta H_{\text{cal}}$ ( $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	$\Delta H_{\text{VH}}$ ( $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
$\alpha$ -sarcina	52.6	136	148
$\alpha$ -sarcina-DMPG	49.1	77	210
$\alpha$ -sarcina-DOPG	49.8	105	105
$\alpha$ -sarcina-PG <sub>b</sub>	47.7	84	100

<sup>a</sup> Temperatura del máximo de capacidad calorífica.

<sup>b</sup> Valores obtenidos de la transición térmica.

cinéticamente, con una  $T_m$  de  $52.6^{\circ}\text{C}$  según los resultados de DSC. Una estimación del incremento de energía libre a  $25^{\circ}\text{C}$  de este proceso proporciona un valor de  $10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , que está en el intervalo de los valores de estabilidad conformacional determinados para otras proteínas hidrosolubles ( $5\text{-}15 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) (Privalov, 1979; Pace, 1975). La  $\alpha$ -sarcina muestra un elevado grado de similitud de secuencia con la RNasa T1 de *Aspergillus oryzae* (Sacco *et al.*, 1983), y con otras RNasas fúngicas de la subfamilia de la RNasa T1, aunque la  $\alpha$ -sarcina posee alrededor de 40 residuos de aminoácidos en exceso. El valor de la temperatura de transición térmica de la RNasa T1 a pH neutro varía entre  $48.9^{\circ}\text{C}$  y  $65.6^{\circ}\text{C}$  (Hu *et al.*, 1992; Plaza del Pino *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1994). Estos valores podrían considerarse similares al de la  $T_m$  de la  $\alpha$ -sarcina, de hecho, la mayoría de los estudios llevados a cabo con la RNasa T1 se han realizado a baja fuerza iónica, mientras que los realizados con la  $\alpha$ -sarcina se han hecho a  $0.1 \text{ M NaCl}$  (para mantener unas condiciones estándar en la formación de los complejos lípido-proteína), y es conocido que



la RNasa T1 se estabiliza por la adición de NaCl (Oobatake *et al.*, 1979; Pace y Grimsley, 1988). Así, el valor de  $T_m$  para la desnaturalización térmica de la RNasa T1 a 0.1 M NaCl y pH neutro es 52.6°C (Hu *et al.*, 1992); sin embargo, en este caso la desnaturalización es totalmente reversible (Plaza del Pino *et al.*, 1992) mientras que la transición térmica de la  $\alpha$ -sarcina no lo es en su totalidad (el porcentaje de recuperación del  $\Delta H_{cal}$  es el 70%). Por otra parte, el  $\Delta H_{cal}$  para la desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -sarcina es 136 kcal·mol<sup>-1</sup>, mientras que el correspondiente a la RNasa T1 se encuentra alrededor de 95 kcal·mol<sup>-1</sup>. Esta diferencia podría ser explicada considerando el mayor número de residuos que posee la  $\alpha$ -sarcina con respecto a la RNasa T1, ya que ambos valores se aproximan notablemente cuando se expresan por mol de residuos de aminoácidos.

Los termogramas de DSC de la proteína unida a membranas sugieren la existencia de diferentes formas de proteína unida. En este sentido, el análisis de la agregación de vesículas lipídicas inducida por  $\alpha$ -sarcina mediante técnicas de flujo detenido (véase Estudio cinético de la agregación y mezcla de lípidos de vesículas de PG y PS producidas por  $\alpha$ -sarcina: medidas de dispersión de luz mediante técnicas de flujo detenido y medidas de transferencia de energía de fluorescencia) revela la participación en el proceso de interacciones proteína-proteína, manteniendo los agregados lípido-proteína. Esto podría explicar la presencia de diferentes conformaciones de la proteína unida. Asimismo, esta última posibilidad de las dos diferentes conformaciones para la proteína unida a membranas se ha manejado para explicar el comportamiento diferencial que muestra la  $\alpha$ -sarcina en cuanto a su capacidad de desestabilizar membranas. Existen diferencias entre los termogramas de la proteína unida a los diferentes tipos de vesículas de PG estudiados, DMPG, DOPG, y PG de huevo. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante DSC tienen en común que tanto la  $T_m$  como el  $\Delta H_{cal}$  son menores comparados con los valores obtenidos para la proteína libre en disolución, lo cual significaría que la proteína unida tiene una menor estabilidad conformacional que la proteína libre.

Las medidas de FTIR revelan que la unión de la  $\alpha$ -sarcina a los diferentes tipos de vesículas de PG produce cambios conformacionales en la proteína, aumenta la accesibilidad al intercambio de hidrógeno por deuterio y disminuye la  $T_m$  de la transición térmica analizada mediante el parámetro empírico ( $I_{1637}/I_{1660}$ ). Estos análisis muestran asimismo que la  $\alpha$ -sarcina desnaturalizada unida a membranas contiene elementos de estructura secundaria,  $\alpha$ -hélice, que no aparece en la  $\alpha$ -sarcina desnaturalizada en disolución. La transición térmica se ha analizado también considerando el parámetro ( $F_{325}/F_{350}$ ). Este cociente ofrece información relativa a los cambios que se producen en el microentorno de los residuos de triptófano de la proteína a consecuencia de la desnaturalización térmica. De nuevo, se observa una disminución en los valores de  $T_m$  de las formas de  $\alpha$ -sarcina

unidas a las membranas.

Cuando se comparan los valores de  $T_m$  obtenidos por las tres metodologías empleadas, se observa que coinciden significativamente. Este parámetro es siempre inferior para las formas unidas a bicapas, siendo el mayor efecto el producido por las vesículas de DOPG seguido por PG de huevo y DMPG. La interacción del ferricitocromo c con membranas de DMPG o DOPG revelan también diferencias sutiles en cuanto a los datos calorimétricos relativos a su transición térmica (Muga *et al.*, 1991). Las únicas diferencias químicas entre los diferentes PG considerados es la presencia de cadenas de acilo insaturadas en DOPG y PG de huevo. Estas diferencias pueden resultar en diferentes grados de fluidez de membrana; sin embargo, por una parte, los complejos  $\alpha$ -sarcina-lípido siempre se han preparado a una temperatura superior a la de transición de fase del correspondiente fosfolípido y, por otra, la transición térmica de la  $\alpha$ -sarcina se produce siempre a temperaturas muy superiores a la de transición del lípido. Por todo esto, es muy probable que las diferencias relativas a este parámetro en el intervalo de temperaturas en el que se produce la transición térmica de la  $\alpha$ -sarcina no sean lo suficientemente grandes como para explicar las variaciones en la  $T_m$  de la desnaturalización. Por otra parte, se ha propuesto que el grado de insaturación de las cadenas de acilo afecta a la red de puentes de hidrógeno interlipídicos en los que intervienen moléculas de agua, y que este proceso es independiente del grado de orden de las cadenas de acilo (Slater *et al.*, 1993). El diferente grado de insaturación de las cadenas de acilo de los fosfolípidos empleados podría resultar en distintas áreas superficiales para cada fosfolípido, lo cual puede afectar a la superficie de hidratación global de las vesículas y, por lo tanto, a las interacciones electrostáticas en las que participan al interaccionar con la  $\alpha$ -sarcina. La  $\alpha$ -sarcina es capaz de distinguir entre PG de huevo y DMPG en términos de mezcla de lípidos. Así, la  $\alpha$ -sarcina promueve agregación y mezcla de lípidos de vesículas de DMPG, mientras que sólo promueve agregación con PG de huevo (véase Estudio cinético de la agregación y mezcla de lípidos de vesículas de PG y PS producidas por  $\alpha$ -sarcina: medidas de dispersión de luz mediante técnicas de flujo detenido y medidas de transferencia de energía de fluorescencia), aunque sí se observa cuando la mezcla se produce entre vesículas de DMPG y PG de huevo. Este comportamiento se ha explicado considerando la existencia de al menos dos tipos de conformaciones de la proteína. Por todo ello, las diferencias observadas entre las vesículas de DMPG, DOPG y PG de huevo podrían deberse al diferente grado de saturación de las cadenas de acilo.

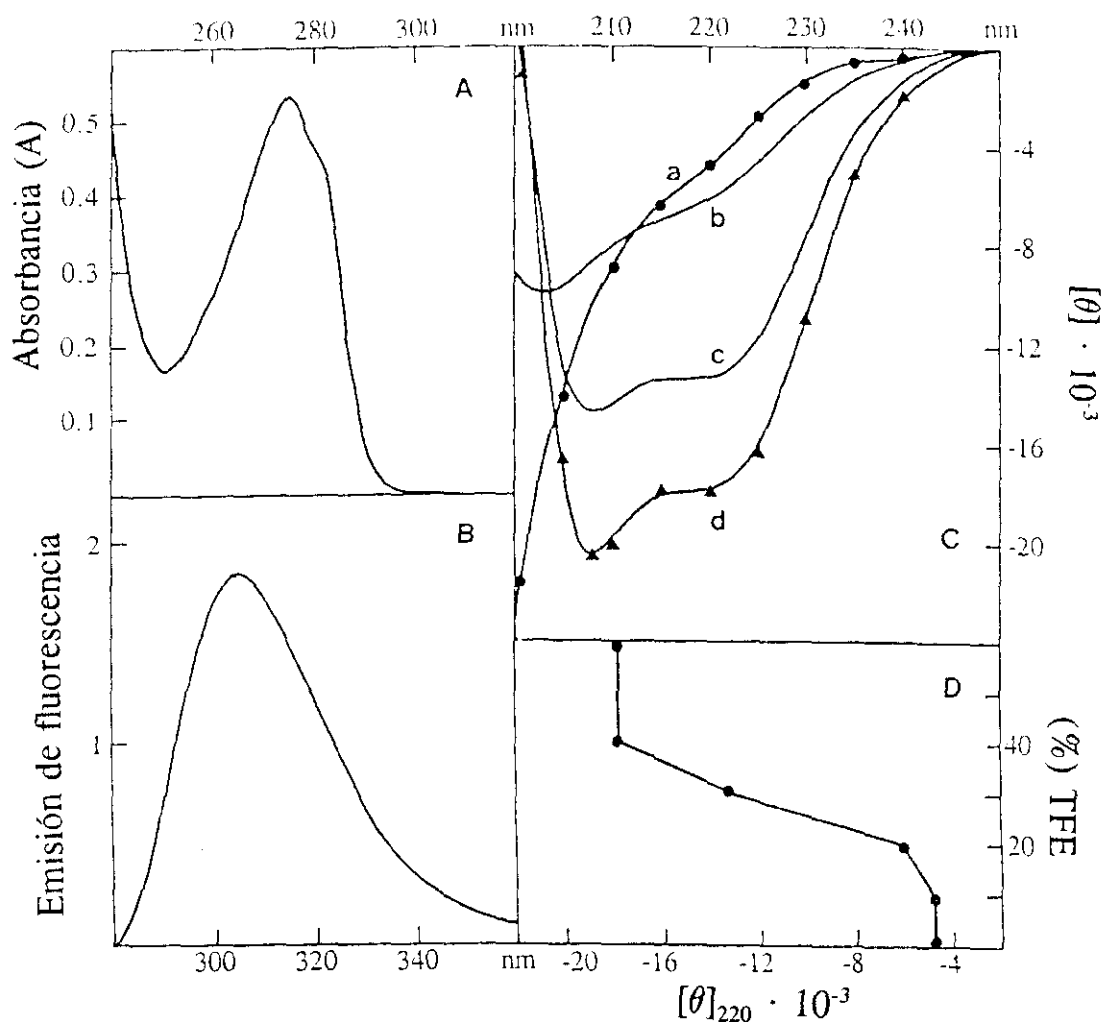
Este estudio demuestra que la interacción de la  $\alpha$ -sarcina con vesículas modelo compuestas por diferentes PG resulta en una desestabilización global de la proteína. Esto queda demostrado por lo siguiente: i) por una disminución de su estabilidad térmica; ii)

por un aumento en la accesibilidad al intercambio hidrógeno por deuterio de los grupos amida del esqueleto peptídico de la forma unida con respecto a la forma libre. La  $\alpha$ -sarcina es una proteína básica; a pH neutro posee una carga neta aproximada de +7 (Sacco *et al.*, 1983). Por lo tanto, su interacción con bicapas de fosfolípidos ácidos está gobernada esencialmente por interacciones electrostáticas (Gasset *et al.*, 1989). Esta interacción produce una reordenación de la molécula de  $\alpha$ -sarcina, ya que las interacciones electrostáticas en las que intervienen los grupos cargados positivamente de la misma han de debilitarse para establecer interacciones con los grupos negativos de las cabezas polares de los fosfolípidos, lo cual podría resultar en una desestabilización de la proteína. Un efecto similar ha sido propuesto para la interacción de ferricitocromo c con vesículas compuestas por fosfolípidos ácidos (Muga *et al.*, 1991). Estos autores destacaron la posibilidad de que una desestabilización conformacional de las proteínas en la superficie de las bicapas podría representar una propiedad general de proteínas polares cuya unión está gobernada esencialmente por interacciones electrostáticas, tal como ocurre con la  $\alpha$ -sarcina. Surewicz *et al.* (1990) observaron una conformación fluctuante ("loose") en la subunidad A de la toxina del cólera, sugiriendo que tal conformación podría ser operativa para permitir su adaptación a diferentes entornos (medio acuoso, interfase disolvente acuoso-membrana e interior hidrofóbico de la bicapa lipídica) en el proceso de inserción y translocación a través de membranas. De acuerdo con esta posibilidad, la subunidad B de esta toxina serviría de portador polar para la subunidad A (Surewicz *et al.*, 1990). Al contrario que la toxina del cólera, la  $\alpha$ -sarcina está formada por una sola cadena polipeptídica. Por lo tanto, la desestabilización observada tras su unión a las bicapas podría ser la responsable de la aparición de una región competente para insertarse en la membrana. Otros autores (Endo *et al.*, 1989) han postulado que los cambios conformacionales mediados por los fosfolípidos podrían ser un factor adicional a aquellos responsables de la inducción y mantenimiento del estado competente de la translocación posttraduccional de proteínas.

## 7. INTERACCION CON MEMBRANAS DEL PEPTIDO SINTETICO $\alpha$ S(116-139) CORRESPONDIENTE A LA REGION (116-139) DE LA SECUENCIA DE LA $\alpha$ -SARCINA

### Caracterización espectroscópica del péptido sintético $\alpha$ S(116-139)

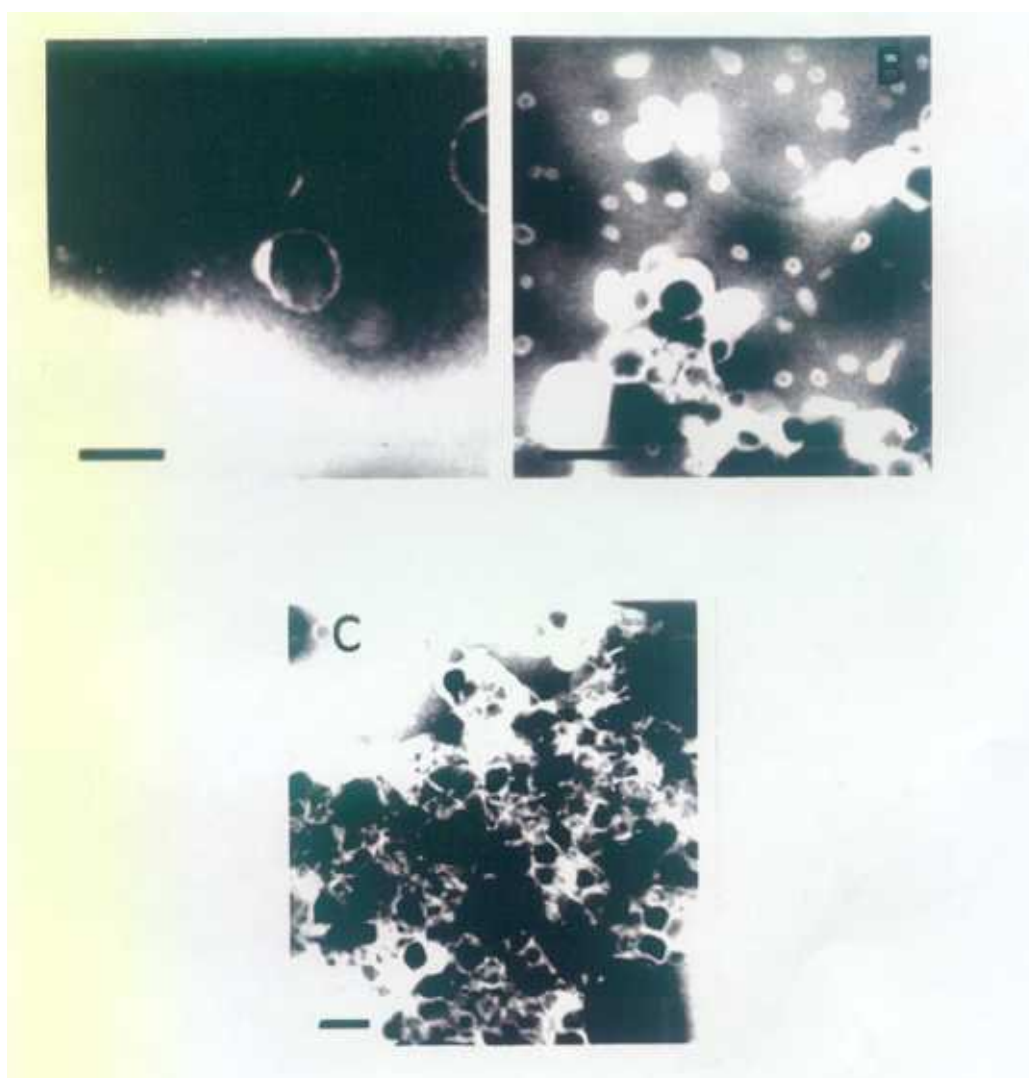
En la figura 43 aparece un resumen de las características espectroscópicas del péptido sintético  $\alpha$ S(116-139). El espectro de absorción UV muestra características típicas de cromóforos de tirosina. El máximo de absorción aparece centrado en torno a los 275 nm. El coeficiente de extinción  $E^{0.1\%}$  (278 nm, 1 cm) es 1.02, lo cual está de acuerdo con la presencia de dos residuos de tirosina como únicos cromóforos presentes en esta región del espectro (figura 43A). El péptido  $\alpha$ S(116-139) exhibe, para una excitación a 275 nm, una única banda de emisión de fluorescencia, con su máximo localizado en torno a los 304 nm (figura 43B). El espectro de dicroísmo circular (CD) en la región del UV-lejano aparece en la figura 43C (espectro a). Los porcentajes de estructura secundaria calculados de este espectro son: 11.0% estructura  $\beta$  antiparalela, 26% giros  $\beta$  y 63% estructura no ordenada. El método empleado para la estimación de los diferentes porcentajes de estructura secundaria a partir de los espectros de CD (Perczel *et al.*, 1991), está basado en datos procedentes de estructuras de proteínas, por lo que podría no ser la aproximación más adecuada para un péptido. En cualquier caso, considerando simplemente la forma del espectro, la presencia de estructura no ordenada en el péptido en disolución es el hecho más destacado. Asimismo, la estructura del péptido sintético ha sido analizada en condiciones en las que se maximiza la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares. El trifluoroetanol (TFE), promueve la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares en polipéptidos, por lo que suele considerarse como un agente mimetizador de membranas. Por todo esto, se ha analizado el efecto del TFE sobre la conformación del péptido, observándose la inducción de conformación helicoidal (figura 43C y 43D). El TFE, hasta una concentración del 10%, no tiene efecto alguno sobre la estructura del péptido, apareciendo una transición conformacional en el intervalo entre 10% y 40% (figura 43D). El espectro de CD (d) en la figura 43C corresponde a una concentración de TFE 60%. La estructura secundaria deducida de este espectro sería: 59%  $\alpha$ -hélice, 17% giros  $\beta$  y 23% estructura no ordenada. En conclusión, el péptido puede adoptar estructuras helicoidales a pesar de la abundancia de residuos desestabilizadores de este tipo de estructura (Val, Ile, Thr o Gly). Finalmente cabe decir que el espectro de CD del péptido sintético en disoluciones acuosas no cambia en el intervalo de concentraciones 0.3-3.0 mg/ml (0.11-1.13 mM).



**Figura 43. Caracterización espectroscópica del péptido  $\alpha$ S(116-139).** (A) Espectro de absorción del péptido  $\alpha$ S(116-139) (0.5 mg/ml). (B) Espectro de emisión de fluorescencia, para una excitación a 275 nm. Las unidades de fluorescencia son arbitrarias. (C) Espectro de dicroísmo circular en: (a) TFE 0-10%; (b) TFE 20%; (c) TFE 30%; (d) TFE 40-60%. Las unidades de elipticidad molar por residuo  $[\theta]$  son grados $\cdot$ cm $^2$  $\cdot$ dmol $^{-1}$ . Los valores teóricos correspondientes a las estructuras secundarias determinadas de los espectros de dicroísmo de acuerdo a Perczel *et al.* (1991) son (●) para el espectro en ausencia de TFE; (▲) en TFE 40%. (D) Elipticidad media por residuo a 220 nm  $[\theta]_{220 \text{ nm}}$ , en unidades de grados $\cdot$ cm $^2$  $\cdot$ dmol $^{-1}$ , frente al porcentaje de TFE. Todas las disoluciones se han preparado en tampón Mops 50 mM, pH 7.0, con NaCl 0.1 y EDTA 1 mM.

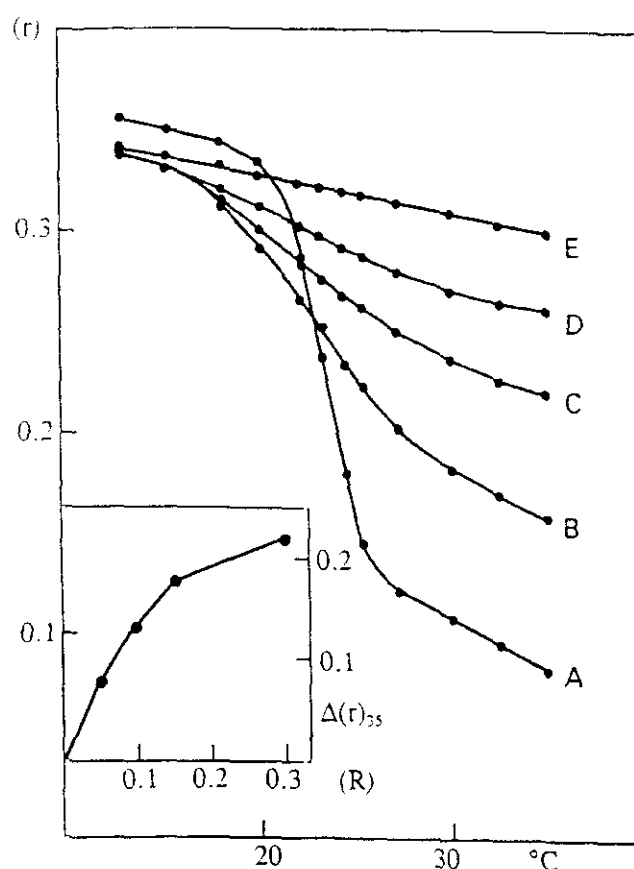
### Interacción del péptido $\alpha$ S(116-139) con vesículas de fosfolípidos

El péptido  $\alpha$ S(116-139) interacciona con vesículas unilamelares grandes de fosfolípidos ácidos. La interacción se puede observar mediante microscopía electrónica. La figura 44B muestra una preparación de vesículas unilamelares grandes de fosfatidilserina (PS) (figura 44A) tratadas con el péptido. Se observan dos tipos de estructuras predominantes. Tras el tratamiento con el péptido, partículas de menos de 50 nm de diámetro son las predominantes, aunque también aparecen agregados de estas partículas. Estas se pueden relacionar con vesículas pequeñas ya que aparentemente conservan la estructura básica de bicapa; no se puede descartar, sin embargo, la presencia de ordenaciones no lamelares.



**Figura 44.** Micrografías electrónicas de (A) vesículas de fosfatidilserina y (B) complejos péptido  $\alpha$ S(116-139) con vesículas de fosfatidilserina a una relación molar lípido/péptido (150:1) y (C) (60:1).

Este último tipo de partículas se podrían relacionar con estructuras discoidales, del mismo tipo que las producidas por la melitina (Dufourcq *et al.*, 1986a,b), por la alameticina (McIntosh *et al.*, 1982; Chapman *et al.*, 1969) y por la  $\delta$ -hemolisina (Freer, 1986). Asimismo, aparecen grandes estructuras resultantes de la agregación de estas pequeñas partículas de 50 nm de diámetro. Un aumento de la relación molar péptido/lípido determina la desaparición de partículas individuales; de hecho, a una relación 60:1 (lípido/péptido) lo único que se observa es una red amorfa de estructuras agregadas (figura 44C). Por lo tanto, aparentemente según los cambios morfológicos producidos por el péptido  $\alpha$ S(116-139), éste provoca fragmentación de vesículas.



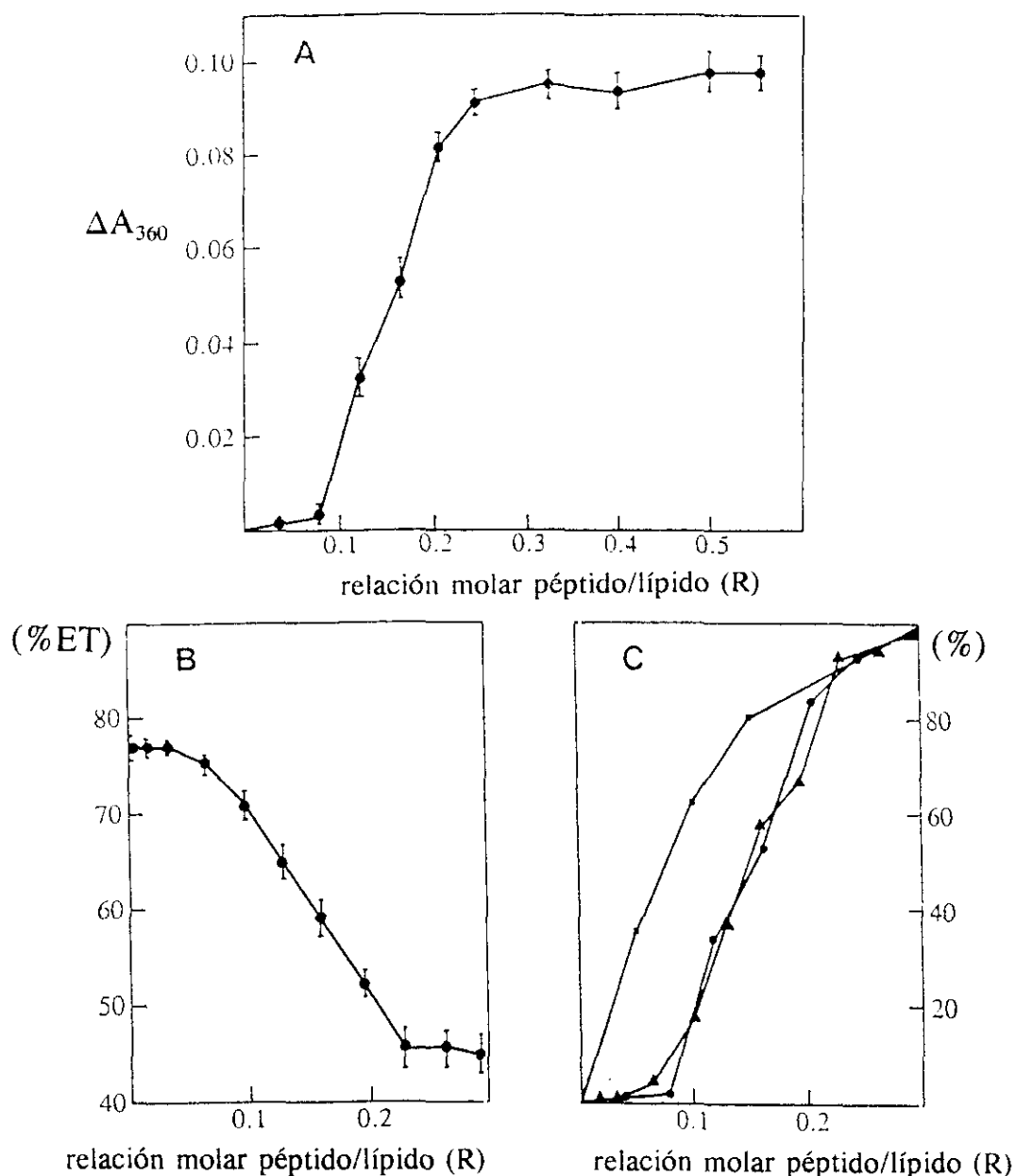
**Figura 45. Efecto del péptido  $\alpha$ S(116-139) sobre el comportamiento termotrópico de vesículas de DMPG.** Las muestras se disolvieron en tampón Mops 50 mM, pH 7.0, con NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM. Se emplea una concentración constante de DMPG-DPH (120 nmoles) y diferentes relaciones molares péptido/lípido: (A) 0; (B) 0.05; (C) 0.10; (D) 0.15 y (E) 0.30. Recuadro: incremento de anisotropía de fluorescencia de DPH medido a  $35^{\circ}\text{C}$ ,  $\Delta(r)_{35}$ , en función de la relación molar lípido/péptido ( $R$ ). Los correspondientes  $\Delta(r)_{35}$  se calculan con respecto el valor de anisotropía del lípido puro a  $35^{\circ}\text{C}$ .

La interacción entre el péptido y las vesículas de fosfolípidos también puede deducirse del análisis de los efectos que produce éste sobre el comportamiento termotrópico de vesículas de DMPG. El péptido modifica la transición de fase de las vesículas. En la figura 45 aparece el perfil de variación de anisotropía de vesículas de DMPG marcadas con DPH, a diferentes relaciones péptido/lípido. Estas medidas se han realizado hasta 60 °C no observándose transiciones adicionales. La anisotropía de fluorescencia del DPH disminuye paulatinamente una vez producida la transición que, en el caso de este fosfolípido, ocurre a los 23°C aproximadamente. La adición de péptido no provoca cambio alguno en dicho valor de temperatura sino que produce una progresiva disminución de la amplitud de la transición a medida que aumenta la relación molar péptido/lípido. El valor de anisotropía disminuye ligeramente en el estado gel, mientras que aumenta significativamente a  $T > T_m$ . Los valores de anisotropía de DPH ( $r$ ) a 35°C se pueden emplear para poner de manifiesto los efectos del péptido sobre el comportamiento termotrópico del lípido (figura 45, recuadro). El efecto del péptido es máximo a una relación molar 3:1 lípido/péptido ( $R = 0.3$ ), en donde se elimina totalmente la transición. La  $\alpha$ -sarcina también disminuye la amplitud de la transición de fase de las vesículas de DMPG, aunque en menor extensión que la producida por el péptido  $\alpha S(116-139)$ . El efecto de la proteína se satura a una relación molar 50:1 (lípido/proteína) sin llegar a eliminar totalmente la transición del fosfolípido (Gasset *et al.*, 1989).

La adición del péptido  $\alpha S(116-139)$  a una suspensión de vesículas de fosfolípidos cargadas negativamente provoca un moderado aumento de la turbidez de la misma. La absorción aparente a 360 nm de la mezcla aumenta con el tiempo, requiriéndose 1 h para estabilizarse dicho valor, aunque el 80% de la variación total se produce en los primeros 10 min de la reacción. En la figura 46A aparece un resumen de los resultados obtenidos. Puede observarse que se requiere una relación molar mínima de 1:10 (péptido/DMPG) para observar variación en la absorción aparente, saturándose el efecto a una relación molar 3:1. Ensayada en las mismas condiciones, la  $\alpha$ -sarcina produce un  $\Delta A_{360}$  máximo 2.5 veces mayor que el producido por el péptido sintético, saturándose el efecto a una relación molar 50:1 (DMPG/péptido) (Gasset *et al.*, 1989). En este caso, este incremento de absorción se ha relacionado con la agregación y fusión de vesículas unilamelares grandes promovida por la proteína (Gasset *et al.*, 1989, 1990).

El péptido  $\alpha S(116-139)$  destabiliza las vesículas de DMPG produciendo mezcla de lípidos entre diferentes vesículas tal y como se detecta mediante el ensayo clásico de dilución de sondas (Struck *et al.*, 1981). En la figura 46B aparece un resumen de los resultados obtenidos con este ensayo. La dependencia del porcentaje de transferencia de energía (%ET) respecto de la concentración de péptido muestra un comportamiento





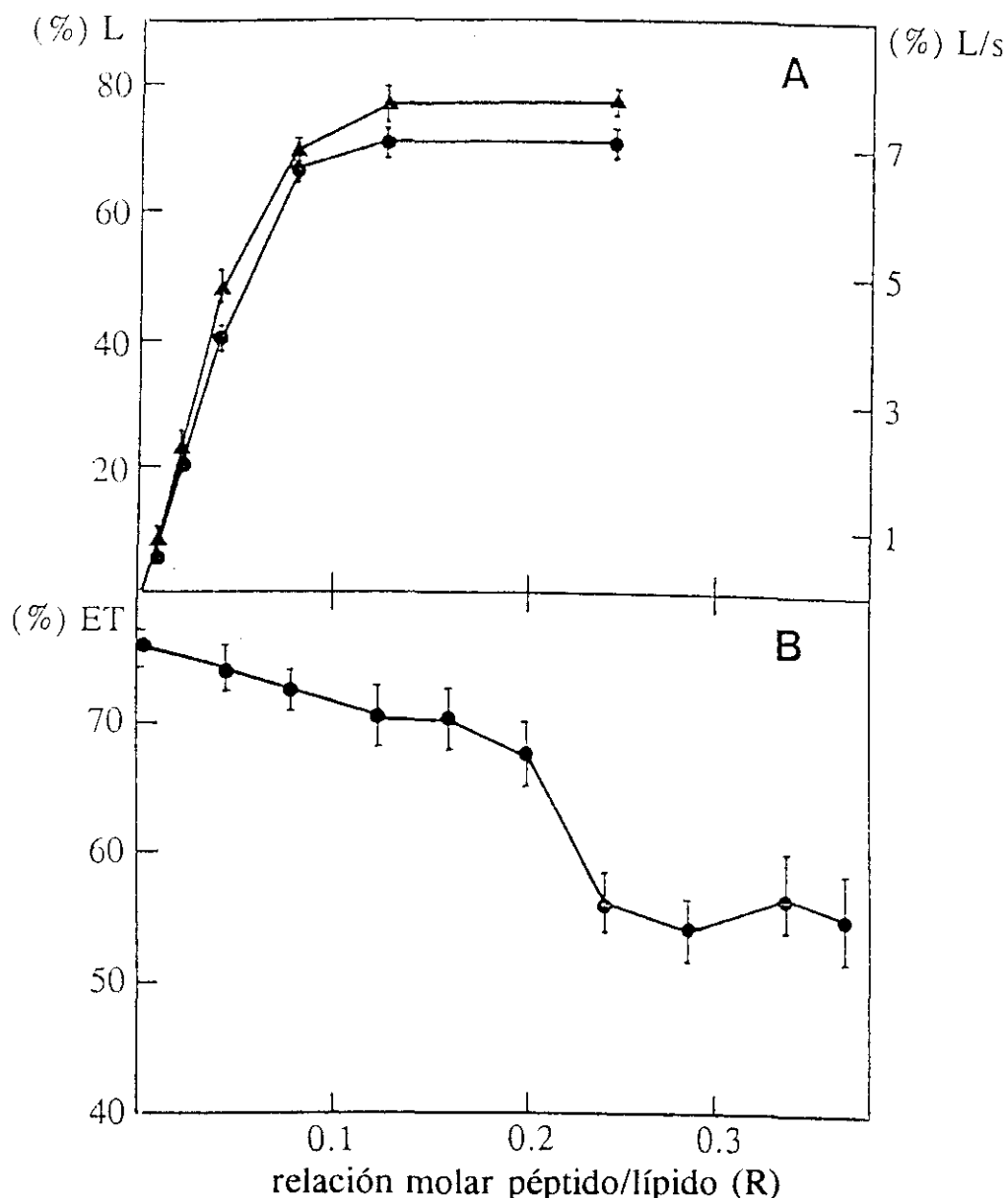
**Figura 46. Estudio de la interacción del péptido  $\alpha S(116-139)$  con vesículas de DMPG.**

(A) Variación de la absorción a 360 nm de una suspensión de vesículas de DMPG (30 nmoles) producida por diferentes cantidades del péptido  $\alpha S(116-139)$ . Los valores de  $\Delta A_{360 \text{ nm}}$  calculados tras 1 h de reacción se representan frente a la relación péptido/lípido (R). (B) Mezcla de lípidos promovida por el péptido sintético  $\alpha S(116-139)$ . Los resultados se expresan como porcentaje de transferencia de energía (%ET), calculados a partir de la emisión de fluorescencia a 530 nm de la sonda NBD-PE (véase parte experimental) tras excitación a 450 nm, frente a la relación molar péptido/lípido (R). La concentración de DMPG fue de 75 nmoles/ml. (C) Porcentajes del máximo  $\Delta A_{360 \text{ nm}}$  (●) y máximo %ET (▲) frente a la relación molar péptido/lípido. (■) Variación de los porcentajes de anisotropía de DPH a 35°C (tomados de la figura 44) frente a la relación molar péptido/lípido. Se considera 100% el valor de anisotropía a 35°C del lípido puro. Todas las disoluciones fueron preparadas en tampón Mops 50 mM, pH 7.0, con NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM. Los resultados son el promedio de tres mediciones independientes.

sigmoideo, similar al que aparece en la variación de los valores de  $\Delta A_{360}$ . El proceso se satura a una relación molar entre 3-4 (lípidos/péptido). La variación del (%ET) en el ensayo de mezcla de lípidos es consistente con una dilución de las sondas entre 4 y 5 veces. Considerando que la relación vesículas marcadas/no marcadas es 1:9, esta observación indicaría que no hay una gran extensión en la mezcla de lípidos, pues la máxima dilución que podría darse sería de 10 veces. En estas condiciones, la  $\alpha$ -sarcina produce la máxima mezcla de lípidos que se puede detectar con este ensayo, hecho que queda corroborado mediante estudios de microscopía electrónica. De nuevo, el efecto se satura a una relación molar 50:1 (lípidos/ $\alpha$ -sarcina).

Cuando los valores de  $\Delta A_{360}$  y de (%ET) se expresan en forma porcentual, considerando la máxima variación observada en cada ensayo como el 100%, y se representan frente a la relación molar péptido/DMPG (figura 46C), puede observarse que los dos procesos son paralelos. Asimismo se pone de manifiesto que el péptido modifica el empaquetamiento de los lípidos, tal y como se deduce del análisis de los efectos del péptido sobre la transición de fase del lípido, a relaciones a las que aún no se ha detectado efecto alguno a nivel de agregación o de mezcla de lípidos. La relación a la que se saturan los tres efectos es, sin embargo, la misma. En este sentido, es interesante destacar que, de acuerdo con la composición de aminoácidos del péptido  $\alpha$ S(116-139), éste presenta una carga neta a pH 7.0 de +4. La variación de  $A_{360}$ , la mezcla de lípidos y la variación de los valores de anisotropía se saturan a una relación molar 3:1 (DMPG/péptido), lo cual corresponde a una relación de cargas de aproximadamente 1.3. Todo ello sugiere la implicación de la neutralización de cargas en el proceso de interacción péptido-lípido.

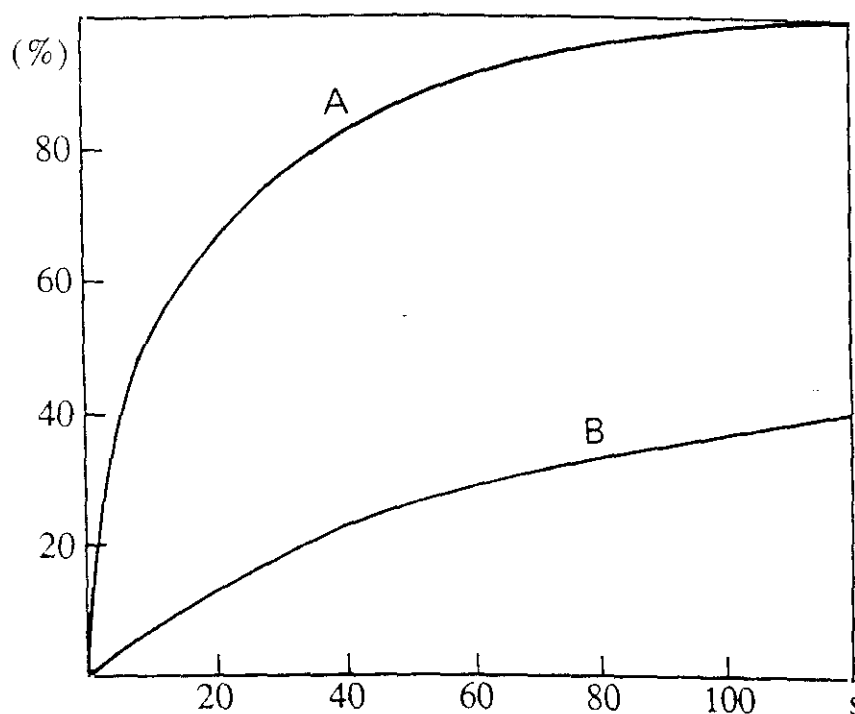
El péptido  $\alpha$ S(116-139) promueve la liberación de los contenidos acuosos de vesículas de PS. La adición del péptido a una suspensión de vesículas de PS que contienen en su interior ANTS-DPX (ver parte experimental) determina un aumento de la intensidad de fluorescencia del ANTS dependiente del tiempo, lo cual es indicativo de la eliminación del apagamiento que ejerce el DPX sobre el ANTS, es decir, indicativo de la liberación y dilución de ambos compuestos al medio extravesicular (Ellens *et al.*, 1985; Parente *et al.*, 1990). La máxima intensidad de fluorescencia observada tras la adición de péptido representa un 70% de la que aparece tras liberar la totalidad de los contenidos acuosos (100% de liberación) mediante la lisis vesicular con Triton X-100 (1% concentración final). El efecto observado es dependiente de la concentración de péptido (figura 47A). Tanto las velocidades iniciales de liberación como la extensión en la que se produce muestran una dependencia similar con la concentración de péptido, saturándose ambos a una relación molar de 10:1 (lípidos/péptido). La  $\alpha$ -sarcina también produce liberación de contenidos acuosos intravesiculares, saturándose su efecto a una relación molar 50:1



**Figura 47. Liberación de contenidos acuosos y mezcla de lípidos de vesículas unilamelares grandes de PS de cerebro bovino promovidas por el péptido  $\alpha$ S(116-139).** (A) Liberación de contenidos acuosos de vesículas de PS (60 nmoles/ml) que contienen ANTS-DPX (ver parte experimental) promovida por el péptido  $\alpha$ S(116-139). Los valores se expresan en forma porcentual considerando 100% como el valor de intensidad de fluorescencia medido tras tratar las vesículas con Triton X-100 a una concentración final del 1% (●) Valores de porcentaje de liberación (%L) 5 min. después de la adición de la correspondiente cantidad de péptido. (▲) Velocidades iniciales de liberación (%L/s) calculadas a partir de las cinéticas de variación de intensidad de fluorescencia del ANTS (véase figura 48). Ambos parámetros se representan frente a la relación molar péptido/lípido (R). (B) Mezcla de lípidos, en unidades de %ET (véase Parte experimental), de vesículas unilamelares grandes de PS inducido por el péptido  $\alpha$ S(116-139). Todos los ensayos han sido realizados en Mops 50 mM, pH 7.0, con NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM, a 37°C y a una concentración constante de lípido (60 nmoles/ml), en un volumen total de 1 ml.

(lípidos/ $\alpha$ -sarcina) (Gasset *et al.*, 1990).

El péptido sintético también produce mezcla de lípidos entre vesículas de PS. Un resumen de los resultados obtenidos aparece en la figura 47B. Cantidades crecientes de péptido hasta una relación molar 5:1 (lípidos/péptido) producen solamente una ligera disminución del %ET, apareciendo una drástica disminución en el intervalo de relaciones molares entre 5 y 3 (R: lípidos/péptido). Puede observarse que los procesos de mezcla de lípidos y de liberación de contenidos intravesiculares no transcurren paralelamente (figuras 47A y 47B). Este mismo aspecto también se deduce del análisis cinético de ambos procesos (figura 48). La liberación de contenidos es un proceso más rápido que el de mezcla de contenidos, en términos de velocidad inicial sería unas 20 veces más rápido. Esto sugiere que la interacción es un proceso secuencial en la que la liberación de contenidos acuosos sería previa a la mezcla de lípidos.



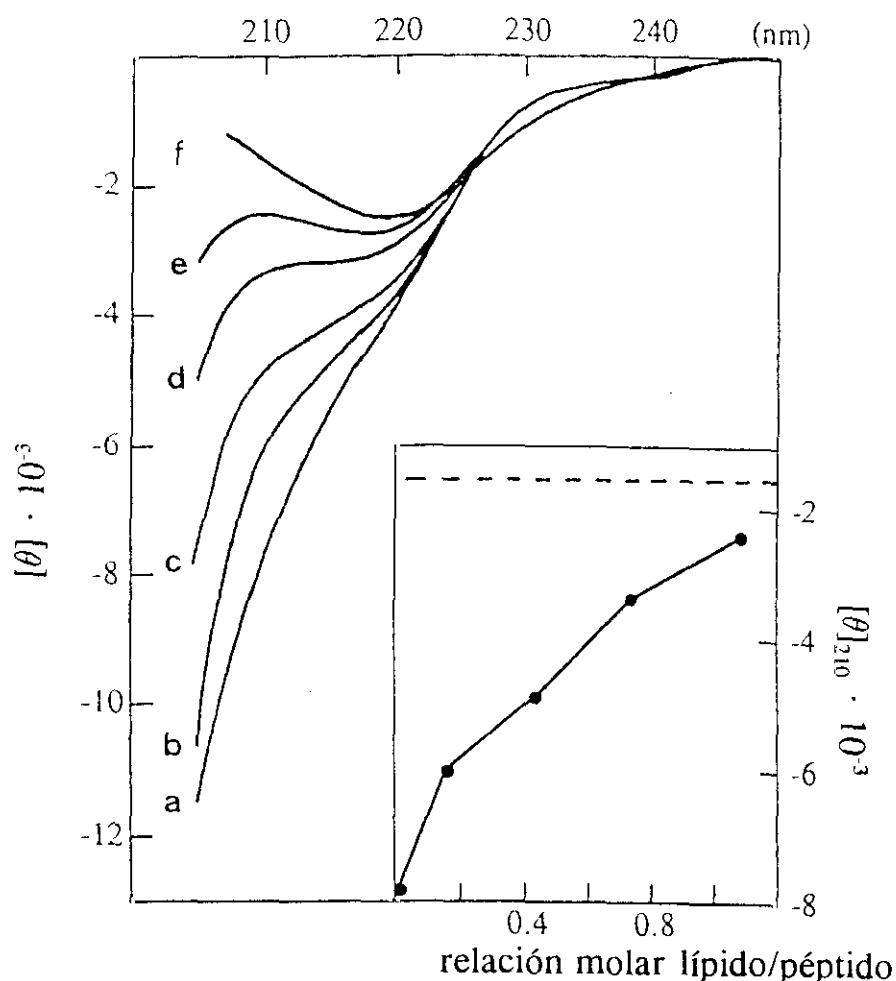
**Figura 48.** Cinéticas de mezcla de lípidos y de liberación de contenidos acuosos de vesículas unilamelares grandes de PS de cerebro promovidas por el péptido  $\alpha$ S(116-139). (A) Cinética de liberación de contenidos acuosos y (B) de mezcla de lípidos, expresadas como porcentajes de las correspondientes variaciones máximas promovidas por el péptido. Ambas cinéticas corresponden a muestras que contienen 60 nmoles de PS y 15 nmoles de péptido a 37°C, en un volumen final de 1 ml.

### **Cambios conformacionales del péptido $\alpha$ S(116-139) inducidos por la interacción con vesículas lipídicas**

La conformación del péptido sintético  $\alpha$ S(116-139) se ve modificada como consecuencia de la interacción con vesículas lipídicas. La figura 49 muestra los espectros de dicroísmo circular de diferentes mezclas péptido-lípido. Es conocido que la turbidez de la muestra puede ser origen de distorsiones en este tipo de espectros; sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, las concentraciones de péptido y de vesículas empleadas, así como el pequeño paso óptico de la cubeta (0.01 cm), minimizaron esta posible distorsión. De hecho, la señal de dicroísmo de la ribonucleasa A, una proteína que no interacciona con estas vesículas, no se ve afectada por valores de turbidez iguales a los producidos por el péptido  $\alpha$ S(116-139) sobre las vesículas. El análisis de los espectros de CD de las mezclas péptido-vesículas muestra un significativo aumento del contenido en estructura  $\beta$ , en oposición al efecto que ejerce el TFE sobre la conformación del péptido, que induce estructuras de tipo  $\alpha$ -hélice (figura 43). El efecto de los fosfolípidos sobre la conformación del péptido se ve saturado a una relación aproximada de 0.3 péptido/lípido, la misma relación que la observada para los otros efectos inducidos por el péptido sobre las vesículas. La estructura secundaria calculada a partir del espectro de CD de una mezcla 3:1 lípido/péptido (figura 49f) estaría compuesta por un 10%  $\alpha$ -hélice, 55% estructura  $\beta$  antiparalela, 8% giros y 27% de estructura no ordenada. Tal y como se ha indicado para el péptido en disolución, estos valores han de tomarse cautelosamente ya que han sido determinados considerando una base de datos relativa a moléculas de proteína y no de péptidos. Además, en este caso los valores significativos de elipticidad que se han considerado son los comprendidos en el intervalo 210-250 nm, lo cual limita la exactitud de la anterior estimación. En cualquier caso, simplemente mediante la observación de la forma de los espectros, cabe concluir que existe una inducción de estructura  $\beta$  a consecuencia de la interacción con vesículas lipídicas. Este aumento en estructura  $\beta$  está claramente en contraste con la inducción de estructura en  $\alpha$ -hélice por TFE (figuras 43C y 43D).

## **DISCUSION**

El modelo de la conformación de la  $\alpha$ -sarcina propuesto en un capítulo anterior propone la existencia en esta proteína de un núcleo hidrofóbico formado por cuatro cadenas  $\beta$ . Este núcleo se ha considerado como un posible candidato responsable de las interacciones hidrofóbicas que se producen entre la  $\alpha$ -sarcina y bicapas lipídicas. Dos de estas cuatro hebras  $\beta$  se encuentran consecutivas en la secuencia de la  $\alpha$ -sarcina, en la



**Figura 49.** Espectros de dicroísmo circular en la región del UV-lejano del péptido  $\alpha S(116-139)$  en ausencia y presencia de vesículas de DMPG. Los diferentes espectros corresponden a diferentes relaciones molares lípido/péptido: (a) 0; (b) 0.15; (c) 0.43; (d) 0.73; (e) 1.07; (f) 3.00. Las unidades de elipticidad molar por residuo,  $[\theta]$ , son grados $\cdot$ cm $^2$  $\cdot$ dmol $^{-1}$ . Recuadro: variación de  $[\theta]$  a 210 nm frente a la relación molar lípido/péptido. Las muestras se prepararon en Mops 50 mM, pH 7.0, con NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM.

región comprendida entre los residuos 120-135. Para evaluar la posible implicación de esta región en las interacciones hidrofóbicas con membranas hemos sintetizado el péptido  $\alpha S(116-139)$  que comprende no sólo las dos anteriores hebras  $\beta$  sino también tres porciones de cuatro residuos que las limitan, y que se predicen como giros  $\beta$ .

Los resultados obtenidos demuestran que el péptido  $\alpha S(116-139)$  interacciona con vesículas unilamelares grandes cargadas negativamente, tanto de fosfolípidos naturales

como de fosfolípidos sintéticos. Los resultados sugieren la implicación de interacciones electrostáticas y de interacciones hidrofóbicas. El efecto del péptido sobre la transición de fase de las vesículas es drástico, y sugiere la inserción del mismo en la bicapa. De hecho, el péptido llega a eliminar totalmente dicha transición, lo cual es precisamente lo esperable para una molécula de carácter integral que restringe la movilidad de las cadenas de acilo de los fosfolípidos. La eliminación de la transición de fase de las bicapas ha sido observada también en la interacción de la cardiotoxina II, un péptido de 60 residuos de aminoácidos, considerado como agente lítico, con vesículas de PS y PG (Faucon *et al.*, 1983). El péptido sintético  $\alpha$ S(116-139) también produce una aparente fragmentación de las vesículas. La disrupción de bicapas de fosfolípidos por polipéptidos en micelas o pequeñas vesículas ha sido observada en otros casos; así, ha sido observada con apolipoproteínas (Brouillette *et al.*, 1984; Anantharamaiah *et al.*, 1985), y con la proteína básica de la mielina (Roux *et al.*, 1994). Un efecto similar ha sido revelado para el péptido glucagón (Jones *et al.*, 1978), melitina (Dufourc *et al.*, 1986, 1989; Dufourcq *et al.*, 1986a,b), alameticina (McIntosh *et al.*, 1982; Chapman *et al.*, 1969) y  $\delta$ -hemolisina (Freer, 1986). A este respecto, la melitina es un péptido lítico de 26 aminoácidos que exhibe cierta similitud de secuencia (alrededor de un 20%) con el péptido  $\alpha$ S(116-139). La liberación de los contenidos acuosos intravesiculares promovida por el péptido  $\alpha$ S(116-139) podría estar relacionada con tales cambios morfológicos. Estos efectos se pueden modelizar del siguiente modo: en primer lugar, el péptido, cargado positivamente, interacciona electrostáticamente con la superficie de la vesícula, que posee una alta densidad de cargas negativas. Posteriormente, teniendo en cuenta la estequiometría de la unión, se produce una neutralización de cargas en el complejo péptido-lípido. Tras esta primera etapa de adsorción electrostática, se pueden producir interacciones hidrofóbicas con la región de las cadenas de acilo de los fosfolípidos, las cuales inducirían perturbaciones a este nivel. Consecuencia directa de estas perturbaciones hidrofóbicas sería la modificación de las propiedades de permeabilidad de las vesículas con lo que se induciría la liberación de contenidos intravesiculares, así como la inducción de fragmentación de las vesículas. Las estructuras resultantes podrían relacionarse con pequeñas vesículas y micelas, según se deriva de las micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica. Cabe decir que no se observa una liberación total de contenidos intravesiculares, que sería lo esperable si el péptido  $\alpha$ S(116-139) actuase a modo de detergente. En cualquier caso, la presencia de estructuras tipo micela no puede descartarse.

El péptido también produce un ligero aumento de la turbidez de la mezcla de reacción. Esta variación de absorción aparente sólo se observa a relaciones molares péptido/lípido mayores que las requeridas para inducir liberación de contenidos acuosos. El valor de absorción aparente, obtenido tras la agregación de vesículas unilamelares

grandes inducida por  $\alpha$ -sarcina, es mucho mayor que el inducido por el péptido. Podría sugerirse que el ligero aumento de turbidez inducido por el péptido se debe a la formación de agregados de las partículas menos de 50 nm de diámetro observadas por microscopía electrónica (figura 44). El péptido también induce mezcla de lípidos entre diferentes vesículas. Este fenómeno requiere relaciones molares péptido/lípido mayores que las necesarias para desencadenar la liberación de contenidos acuosos y para la inducción de perturbaciones en la bicapa. Por ello, la mezcla de lípidos podría ocurrir en los agregados anteriores. Esto podría estar corroborado por el hecho de que no se observa una extensiva mezcla de lípidos. Las estructuras más pequeñas formadas por el péptido, estructuras de tipo micela, no estarían implicadas en tal mezcla, por lo que la dilución de las sondas no podría darse en toda la población de vesículas. El valor mínimo de %ET sería mayor que el esperado si se produjese la máxima mezcla de lípidos.

La dependencia con respecto a la concentración de péptido, tanto de la mezcla de lípidos como de la variación de absorción, podría sugerir la existencia de interacciones péptido-péptido. Con respecto a esta posibilidad, no se han detectado cambios en la estructura secundaria del péptido  $\alpha$ S(116-139) en un amplio intervalo de concentraciones, lo cual podría descartar la posibilidad de que la unidad competente para interactuar con membranas sea un agregado de péptidos monoméricos. Asimismo, el péptido posee un residuo de cisteína que podría participar en un proceso de agregación tras la interacción con membranas. Sin embargo, la carboxiamidometilación de mezclas péptido-vesículas revela la ausencia de residuos de cistina.

En cuanto a la posible relación entre el péptido como tal y como parte estructural de la  $\alpha$ -sarcina, se puede decir que los efectos observados inducidos por ambos sobre membranas son cualitativamente similares. La  $\alpha$ -sarcina, al igual que el péptido, induce mezcla de lípidos, liberación de contenidos acuosos y alteraciones en el empaquetamiento lipídico. Sin embargo, se observan diferencias significativas en cuanto a los cambios morfológicos inducidos sobre las membranas. Mientras que el péptido produce una fragmentación aparente de las vesículas, la  $\alpha$ -sarcina induce grandes agregados de las mismas, así como estructuras fusionadas (Gasset *et al.*, 1990). Asimismo, cabe destacar el hecho de que el residuo de cisteína-132 de la  $\alpha$ -sarcina, equivalente al del péptido  $\alpha$ S(116-139), participa en la formación de un puente disulfuro en la proteína nativa. Esta diferencia estructural podría ser un motivo que origine las diferencias de comportamiento con vesículas que se observan entre ambos. Sin embargo, a pesar de ello, la capacidad del péptido  $\alpha$ S(116-139) para interactuar con membranas permite proponer a esta región como participante en las interacciones hidrofóbicas entre la  $\alpha$ -sarcina y membranas. El espectro de CD del péptido  $\alpha$ S(116-139) en presencia de lípidos revela un alto contenido



en estructura  $\beta$ , en contraste con la inducción de estructura  $\alpha$ -hélice producida por TFE. Este se ha considerado, en ocasiones, como un promotor de estructuras helicoidales (Merutka y Stellwagen, 1989; Nelson y Kallenbach, 1989), así como un potenciador de  $\alpha$ -hélices (Narayanan *et al.*, 1986). En este último caso, la formación de estructuras helicoidales se produce en tanto en cuanto los residuos de aminoácidos del polipéptido tengan una propensión intrínseca para formar este tipo de estructuras. En cualquier caso, se suele considerar como agente mimetizador de membranas, por cuanto promueve la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, del mismo modo que las membranas. Así, aunque el péptido sintético puede adoptar una estructura helicoidal en presencia de TFE, ésta no es la conformación adoptada en presencia de vesículas lipídicas. En este sentido, péptidos sintéticos correspondientes al dominio de unión de lípidos de la proteína apo B-100, adoptan una estructura preferentemente  $\beta$  en presencia de lípidos (Lins *et al.*, 1994), hecho que contrasta con la adopción de estructuras helicoidales por numerosos péptidos tras su interacción con bicapas (Martin *et al.*, 1993). Lins *et al.*, (1994) sugieren que una estructura  $\beta$  hidrofóbica podría ser un motivo estructural activo como agente interaccionante con membranas. Una conclusión similar podría obtenerse para el péptido  $\alpha$ S(116-139) de la  $\alpha$ -sarcina: las anteriores cadenas  $\beta$  predichas en la  $\alpha$ -sarcina podrían estar implicadas en la interacción hidrofóbica que se produce entre la  $\alpha$ -sarcina y las membranas.

## CONCLUSIONES

1. La  $\alpha$ -sarcina interacciona con las vesículas de DMPS de modo similar a como lo hace con las de DMPG. La diferente afinidad observada se explicaría en virtud de la capacidad que tiene la PS para formar puentes de hidrógeno interlipídicos, y de la que carece el PG.

2. La  $\alpha$ -sarcina es capaz de degradar tRNA encapsulado en vesículas de asolectina. A su vez, la toxina es degradada por tripsina encapsulada en tales vesículas. Estas observaciones estarían de acuerdo con una translocación de la  $\alpha$ -sarcina al interior vesicular.

3. La interacción de la  $\alpha$ -sarcina con las vesículas conduce a la formación de un dímero de éstas, mantenido por interacciones proteína-proteína. Esto sucede en una escala de tiempo del orden de milisegundos. La posterior desestabilización de la bicapa sucede en una escala del orden de segundos.

4. La interacción de la  $\alpha$ -sarcina con vesículas se traduce en una disminución de la estabilidad de la proteína.

5. La interacción de la  $\alpha$ -sarcina con vesículas no requiere de la estructura nativa de la proteína. La  $\alpha$ -sarcina reducida y carboxiamidometilada, que sólo contendría estructura  $\beta$  y giros  $\beta$ , como ordenaciones periódicas, promueve sobre vesículas similares efectos a los causados por la proteína nativa.

6. La  $\alpha$ -sarcina presentaría una lámina  $\beta$  hidrofóbica, que estaría implicada en las interacciones de la proteína con la zona de las cadenas de acilo de la bicapa. Un péptido sintético que contiene la región (116-139) de la proteína, en la que estarían dos de las hebras de la anterior lámina, origina efectos sobre las vesículas similares a los que produce la proteína. Dicho péptido adopta una conformación  $\beta$  al interaccionar con las vesículas.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Abola, E.E., Berstein, F.C., Bryant, S.H., Koetzle, T.F. y Weng, J. (1987) En *Crystallographic Databases* (Allen, F.H., Gergerhoff, G. y Sievers, R., Eds.); pp. 107-132. Cambridge, Chester.
- Alder, G.M., Bashford, C.L. y Pasternak, C.A. (1990) *J. Membr. Biol.*, **113**, 67-74
- Allured, V.S., Collier, R.J., Carroll, S.F. y McKay, D.B. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1320-1324
- Alonso, M.A. y Carrasco, L. (1981) *FEBS Lett.*, **127**, 112-114
- Alonso, M.A. y Carrasco, L. (1982) *Eur. J. Biochem.*, **127**, 567-569
- Anantharamaiah, G.M., Jones, J.L., Brouillet, C.G., Schmidt, C.F., Hong-Chung, B., Hughes, T.A., Bhown, A.S. y Segrest, J.P. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 10248-10255
- Anba, J., Pagès, J.M. y Lazdunski, C. (1986) *FEMS Microbiol. Lett.*, **324**, 215-219
- Aron, G.M. e Irvin, J.D. (1980) *Agents Chemother.*, **17**, 1032-1033
- Arvinte, T., Hildenbrand, K., Wahl, P. y Nicolau, C. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 962-966
- Arrondo, J.L.R., Young, N.M. y Mantsch, H.H. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **952**, 261-268
- Arrondo, J.L.R., Muga, A., Castresana, J. y Goñi, F.M. (1993) *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **59**, 23-56
- Batenburg, A.M., Bougis, P.E., Rochat, H., Verkleij, A. y de Kruijff, B. (1985) *Biochemistry*, **24**, 7101-7110
- Batenburg, A.M., Hibbeln, J.C.L., Verkleij, A.J. y de Kruijff, B. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **903**, 155-165
- Barbieri, L., Zamboni, M., Lorenzoni, E., Montanaro, L., Sperti, S. y Stirpe, F. (1980) *Biochem. J.*, **186**, 443-452
- Barbieri, L. y Stirpe, F. (1982) *Canc. Surv.*, **1**, 490-520
- Baum, J., Dobson, C.M., Evans, P.A. y Hanley, C. (1989) *Biochemistry*, **28**, 7-13
- Bentz, J. y Ellens, H. (1988) *Colloids Surf.*, **30**, 65-112
- Berstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J.B., Meyer, E.F. Jr., Brice, M.D., Rodgers, J.R., Kennard, O., Shimanouchi, T. y Tasumi, M. (1977) *J. Mol. Biol.* **112**, 535-542
- Bezborodova, S.L., Khodova, O.M. y Stepanov, V.M. (1983) *FEBS Lett.*, **159**, 256-258
- Bisson, R. y Montecucco, C. (1985) en *Progress in Lipid-Protein Interaction* (Watts, A. y Pont, J.J.H.M.M., Eds.); pp. 259-287. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam
- Bisson, R. y Montecucco, C. (1986) en *Techniques for the analysis of membrane proteins* (Cherry, R. y Ragan, I.C., Eds.); pp. 153-184, Chapman y Hall, London
- Blewitt, M.G., Zhao, J.M., McKeever, B., Sarma, R. y London, E. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 286-290
- Blewitt, M.G., Chung, L.A. y London, E. (1985) *Biochemistry*, **24**, 5458-5464
- Blumenthal, R. (1987) *Curr. Top. Membr. Trans.* **29**, 203-254
- Boggs, J.M. (1980) *Can. J. Biochem.*, **58**, 755-770
- Boggs, J.M., Koshy, K.M., Rangaraj, G. (1984) *Chem. Phys. Lipids*, **36**, 65-89
- Boggs, J.M., Chia, L.S., Rangaraj, G. y Moscarello, M. (1986) *Chem. Phys. Lipids.*, **39**, 165-184
- Brouillette, C.G., Jonez, J.L., Ng, T.C., Kercret, H., Hong-hung, B. y Segrest, J.P. (1984) *Biochemistry*, **23**, 359-367
- Brown, J.E., Griffin, D.E., Leppla, S.H. y Rothman, S.W. (1980) *FEBS Lett.*, **117**, 84-88
- Brosins, J., Dull, T.J. y Noller, H.E. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 201-204

- Bychkova, V.E., Pain, R.H. y Ptitsyn, O.B. (1988) *FEBS Lett.*, **238**, 231-234
- Cabiaux, V., Brasseur, R., Wattiez, R., Falmagne, P., Ruysschaert, J.M. y Goormaghtigh, E. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 4928-4938
- Carrasco, L. y Esteban, M. (1982) *Virology*, **117**, 62-69
- Cevc, G., Watts, A. y Marsh, D. (1981) *Biochemistry*, **20**, 4955-4965
- Chang, M.C., Saksena, S.K., Lau, I.F. y Wang, Y.H. (1979) *Contraception*, **19**, 175-184
- Chang, M.P., Baldwin, R.L., Bruce, C. y Winieski, B.J. (1989) *Science*, **246**, 1165-1168
- Chapman, D., Cherry, R.J., Finer, E.G., Hauser, H., Phillips, M.C., Shipley, G.G. y McMullen, A. (1969) *Nature*, **224**, 692-694
- Chaudhary, V.K., Jinno, Y., FitzGerald, D.J. y Pastan, I. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 308-312
- Cheifetz, S. y Moscarello, M.A. (1985) *Biochemistry*, **24**, 1909-1914
- Chen, W.J. y Douglas, M.G. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 15605-15609
- Chirgadze, Y.N., Fedorov, O.V. y Trushina, N.P. (1975) *Biopolymers*, **14**, 679-694
- Choe, S., Bennet, M.J., Fujii, G., Curmi, P.M.G., Kantardjieff, K.A., Collier, R.J. y Eisenberg, D. (1992) *Nature*, **357**, 216-222
- Chou, Y. y Fasman, G.D. (1978) *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 251-276
- Chung, L., Kaloyanides, G., McDaniel, R., McLaughlin, A. y McLaughlin, S. (1985) *Biochemistry*, **24**, 442-452
- Collier, R.J. (1982) En *ADP ribosylation reactions; Biology and Medicine* (Hayashi, O. y Ueda, K., Eds.); pp. 573-592. Academic Press. New York
- Collins, C.M. y Collier, R.J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, **828**, 138-143
- Collins, C.M. y Collier, R.J. (1987) *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.*, **45**, 41-52
- Conde, F.P., Fernández-Puentes, C., Montero, M.T.V. y Vázquez, D. (1978) *FEMS Microbiol. Lett.*, **4**, 349-355
- Connor, J., Bucana, C., Fiedler, I.J. y Schroit, A.J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3184-3188
- D'Alessio, G., Didonato, A., Parente, A. y Picoli, R. (1991) *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 104-106
- De Vrije, G.J., De Swart, R.L., Dowhan, W., Tomassen, J. y De Kruijff, B. (1988) *Nature*, **334**, 173-175
- Demel, R.A., Paltauf, F., and Hauser, H. (1987) *Biochemistry*, **26**, 8659-8665
- Devaux, P.F. y Seigneuret, M. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 64-125
- Dolgikh, D.A., Gilmanshin, R.I., Brazhnikov, E.V., Bychkova, V.E., Semisotnov, G.V., Venyaminov, S. y Ptitsyn, O.B. (1981) *FEBS Lett.*, **136**, 311-315
- Dolgikh, D.A., Kolomiets, A.P., Bolotina, I.A. y Ptitsyn, O.B. (1984) *FEBS Lett.*, **165**, 88-92
- Donovan, J.J., Simon, M.I., Draper, R.K. y Montal, M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 172-176
- Donovan, J.J., Simon, M.I. y Montal, M. (1982) *Nature*, **298**, 669-672
- Doolittle, R.F. y Feng, D.F. (1990) *Methods Enzymol.*, **183**, 659-669
- Draper, R.K. y Simon, M.I. (1980) *J. Cell Biol.*, **87**, 849-854
- Dufourc, E.J., Smith, I.C.P. y Dufourcq, J. (1986) *Biochemistry*, **25**, 6448-6455
- Dufourc, E.J., Bonmatin, J.M. y Dufourcq, J. (1989) *Biochimie*, **71**, 117-123
- Dufourcq, J., Faucon, J.F., Fourche, G., Dasseux, J.L., Le Maire, M. y Gulik-Krzywicki, T. (1986a) *Biochim. Biophys. Acta*, **859**, 33-48
- Dufourcq, J., Faucon, J.F., Fourche, G., Dasseux, J.L., Le Maire, M. y Gulik-Krzywicki, T. (1986b) *FEBS Lett.*, **201**, 205-209
- Dumont, M.E. y Richards, F.M. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 4147-4156

- Düzgünes, N., Wilschut, J., Fraley, R. y Papahadjopoulos, D. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **64**, 182-195
- Düzgünes, N., Wilschut, J. y Papahadjopoulos, D. (1985) En *Physical Methods on Biological Membranes and their Model Systems*, (Conti, F. et al. Eds.); pp. 193-218. Plenum Press, New York
- Düzgünes, N. y Shavnin, S.A. (1992) *J. Membr. Biol.*, **128**, 71-80
- Düzgünes, N. y Wilschut, J. (1993) *Methods Enzymol.* **220**, 3-14
- Edwards, G.M., DeFeo-Jones, D., Tai, J.Y., Vuocolo, G.A. y Patrick, D.R. (1989) *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 2860-2868
- Eilers, M. y Schatz, G. (1986) *Nature*, **322**, 228-232
- Eilers, M., Hwang, S. y Schatz, G. (1988) *EMBO J.*, **7**, 1139-1145
- Eklund, K.K. (1990) *Chem. Phys. Lipids*, **52**, 199-206
- Ellens, H., Bentz, J. y Szoka, F.C. (1985) *Biochemistry*, **24**, 3099-3106
- Ellis, R.J. y Robinson, C. (1987) *Adv. Bot. Res.*, **14**, 1-19
- Endo, T., Eilers, M. y Schatz, G. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 2951-2956
- Endo, Y. y Wool, I. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 9054-9060
- Endo, Y., Huber, P.W. y Wool, I. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 2662-2667
- Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M. y Tsurugi, K. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 5908-5912
- Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T. y Igarashi, K. (1988) *Eur. J. Biochem.*, **171**, 45-50
- Engelman, D.M. y Steitz, T.A. (1981) *Cell*, **23**, 411-422
- Epand, R.M. (1993) en *The Amphipathic Helix* (Epand, R.M. Ed.) CRC Press Boca Ratón
- Eperon, I.C., Anderson, S. y Nierlich, D.P. (1980) *Nature* **286**, 460-467
- Eytan, G.D. y Almary, T. (1983) *FEBS Lett.*, **156**, 29-32
- Fabian, H., Schultz, C., Naumann, D., Landt, O., Hahn, U. y Saenger, W. (1993) *J. Mol. Biol.*, **232**, 967-981
- Farahbakhsh, Z.T., Baldwin, R.L. y Wisnieski, B.J. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 2256-2261
- Farahbakhsh, Z.T. y Wisnieski, B.J. (1989) *Biochemistry*, **28**, 580-585
- Farias, R.N., Vinals, A.L. y Moreno, R.D. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **128**, 68-74
- Faucon, J.F., Dufourcq, J., Bernard, E., Duchesneau, L. y Pezotlet, M. (1983) *Biochemistry*, **22**, 2179-2185
- Feigenson, G.W. (1986) *Biochemistry*, **25**, 5819-5825
- Fernández-Luna, J.L., López-Otín, C., Soriano, F. y Méndez, E. (1985) *Biochemistry*, **24**, 861-867
- Fernández-Puentes, C. y Vázquez, D. (1977) *FEBS Lett.*, **78**, 143-146
- Fernández-Puentes, C. y Carrasco, L. (1980) *Cell*, **20**, 769-775
- Foa-Tomasi, L., Campadelli-Fiume, G., Barbieri, L. y Stirpe, F. (1982) *Experientia*, **37**, 257-259
- Frankel, A., Schlossman, D., Welsh, P., Hertler, A., Withers, D. y Johnston, S. (1989) *Mol. Cell Biol.*, **9**, 415-420
- Freer, J.H. (1986) en: *Natural Toxins*, (Harris, J.B. Ed.) Clarendon Press, Oxford, cap. 11
- Freire, E. y Biltonen, R.L. (1978) *Biopolymers*, **17**, 463-479
- Freire, E., van Osdol, W.W., López-Mayorga, O. y Sánchez-Ruiz, J.M. (1990) *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, **19**, 159-188
- Fujii, G., Selsted, M.E. y Eisenberg, D. (1993) *Protein Sci.*, **2**, 1301-1312
- Gad, A.E., Silver, G.L. y Eytan, G.A. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **690**, 124-132

- Gasset, M., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1989) *Biochem. J.*, **258**, 815-822
- Gasset, M., Oñaderra, M., Thomas, P.G. y Gavilanes, J.G. (1990) *Biochem. J.*, **265**, 815-822
- Gasset, M., Oñaderra, M., Martínez del Pozo, Schiavo, G.P., Laynez, J., Usobiaga, P. y Gavilanes, J.G. (1991a) *Biochim. Biophys. Acta*, **1068**, 9-16
- Gasset, M., Oñaderra, M., Goormaghtigh, E. y Gavilanes, J.G. (1991b) *Biochim. Biophys. Acta*, **1080**, 51-58
- Gavilanes, J.G., Vázquez, D., Soriano, F. y Méndez, E. (1983) *J. Prot. Chem.*, **2**, 251-261
- Gavilanes, J.G., Menéndez Arias, L. y Rodríguez, R. (1984) *Comp. Biochim. Physiol.*, **77B**, 83-88
- Gavilanes, J.G., Lizarbe, M.A., Municio, A.M. y Oñaderra, M. (1985) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **26**, 187-194
- Gennis, R.B. (1989) en *Biomembranes: Molecular Structure and Function* (Cantor, Ch.R. Ed.) ; pp. 1-35. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokio
- Ghrayeb, J., Kimura, H., Takahara, M., Hsuing, H., Masui, Y. y Endo, Y. (1984) *EMBO J.*, **3**, 2437-2442
- Gibrat, J.F., Gardiet, J. y Robson, B. (1987) *J. Mol. Biol.*, **198**, 425-443
- Giles, A.M., Imhoff, J.M. y Keil, B.;(1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 1462-1468
- Gill, D.M., Clements, J.D., Robertson, D.C. y Finkelstein, R.A. (1981) *Infect. Immunol.*, **33**, 677-682
- Goormaghtigh, E, Cabiaux, V. y Ruyschaert, J.M. (1990) *Eur. J. Biochem.*, **193**, 409-420
- Goormaghtigh, E. y Ruyschaert, J.M. (1991) en *Molecular Description of Biological Components* (Brasseur, R. Ed.) Vol. I, CRC Press, Boca Raton, FL
- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., De Meutter, J., Rosseneu, M. y Ruyschaert, J.M. (1993) *Biochemistry*, **32**, 6104-6110
- Goldin, A., Serpick, A.A. y Mantel, N. (1966) *Cancer Chem. Rep.*, **50**, 173-218
- Gorlich, D., Hartmann, E., Prehn, T.A. y Rapoport, T.A. (1992) *Nature*, **357**, 47-52
- Goto, Y. y Fink, A.L. (1989) *Biochemistry*, **28**, 945-952
- Greenfield, L. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 6853-6857
- Hakoshima, T., Itoh, T., Tomita, K., Goda, K., Nishikawa, S., Morioka, H., Uesugi, S., Ohtsuka, E. y Ikehara, M. (1992) *J. Mol. Biol.*, **223**, 1013-1028
- Haltia, T., Semo, N., Arrondo, J.L.R., Goñi, F. y Freire, E. (1994) *Biochemistry*, **33**, 9731-9740
- Harley, S.M. y Lord, J.M. (1985) *Plant Sci.*, **41**, 111-116
- Harter, C., Bächli, T., Semenza, G. y Brunner, J. (1988) *Biochemistry*, **27**, 1856-1864
- Hausman, S.Z. y Burns, L.B. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 13735-13739
- Hausner, T.P., Atmadja, J. y Nierhaus, K.H. (1987) *Biochimie*, **69**, 911-923
- Hay, R., Böhni, P. y Gasser, S. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, **779**, 65-87
- Helm, Ch.A. y Israelachvili, J.N. (1993) *Methods Enzymol.* **220**, 130-143
- Hendrick, J.P. y Hartl, F-U. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 349-384
- Henze, P.P.C., Hahn, H., Enlmann, V.A. y Ulbrich, N. (1990) *Eur. J. Biochem.*, **192**, 127-131
- Hill, C.P., Yee, J., Selsted, M.E. y Eisenberg, D. (1991) *Science*, **251**, 1481-1485
- Hirabayashi, J. y Yoshida, H. (1983) *Biochem. Int.*, **7**, 255-262
- Hobden, A.N. y Cundliffe, E. (1978) *Biochem. J.*, **170**, 57-61



- Hoch, D.H., Romero-Mira, M., Ehrlich, B.E., Finkelstein, A., DasGupta, B.R. y Simpson, L.L. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1692-1696
- Hoekstra, D. y Kok, J.W. (1989) *Biosci. Rep.*, **9**, 273-305
- Hoekstra, D. y Düzgünes, N. (1993) *Methods Enzymol.* **220**, 15-32
- Hong, K., Yoshimura, T. y Papahadjopoulos, D. (1985) *FEBS Lett.*, **191**, 17-23
- Hong, K. y Vacquier, V.D. (1986) *Biochemistry*, **25**, 543-549
- Hong, K., Meers, P.R., Düzgünes, N. y Papahadjopoulos, D. (1991) en *Membrane Fusion* (Wilschut, J. y Hoekstra, D. Eds.); pp. 195-208. Marcel Dekker, New York
- Hope, M.J., Bally, M.B., Webb, G. y Cullis, P.R. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 55-65
- Horn, R.G. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, **778**, 224-228
- Houston, L.L. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 1532-1539
- Hu, V.W. y Holmes, R.K. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 12223-12233
- Hu, C-Q., Sturtevant, J.M., Thompson, J.A., Erickson, R.E. y Pace, C.N. (1992) *Biochemistry*, **31**, 4876-4882
- Hübner, W., Mantsch, H.H., Paltauf, F. y Hauser, H. (1994) *Biochemistry*, **33**, 320-326
- Hui, S.W., Steward, T.P., Boni, L.T. y Yeagle, P.L. (1981) *Science*, **212**, 921-923
- Hwang, J., FitzGerald, D.J., Adhya, S. y Pastan, I. (1987) *Cell*, **48**, 129-136
- Idziorek, T., FitzGerald, D. y Pastan, I. (1990) *Infect. Immun.*, **58**, 1415-1420
- Jiang, J.X. y London, E. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 8636-8641
- Jinno, Y., Chaudhary, V.K., Kondo, T., Adhya, S., FitzGerald, D.J. y Pastan, I. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 13203-13207
- Jinno, Y., Ogata, M., Chaudhary, V.K., Willingham, M.C. y Adhya, S. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 15953-15959
- Jirgensons, B. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **623**, 69-76
- Johson, V.G. (1990) *Science*, **250**, 832-834
- Jones, A.J.S., Epand, R.M., Lin, K.F., Walton, D. y Vail, W.J. (1978) *Biochemistry*, **17**, 2301-2307
- Kajava, A.V., Bogdanov, M.V. y Nesmeyanova, M.A. (1991) *J. Biomol. Struct. Dynamics*, **9**, 143-157
- Kanaya, S. y Uchida, T. (1986) *Biochem. J.*, **240**, 163-170
- Karplus, P.A. y Schulz, G.E. (1986) *Naturwissenschaften*, **72**, 212-213
- Katzin, B.J., Collins, E.J. y Robertus, J.D. (1991) *Proteins: Struc. Funct. Genet.*, **10**, 251-259
- Kauppinen, J.K., Moffat, D.J., Cameron, D.G. y Mantsch, H.H. (1981) *Appl. Opt.*, **20**, 1866-1879
- Kennedy, S.J. (1978) *J. Membr. Biol.*, **42**, 265-279
- Kim, J. y Kim, H. (1986) *Biochemistry*, **25**, 7867-7874
- King, D.S., Fields, C.G. y Fields, G.B. (1990) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **36**, 255-266
- Kozlov, Y.V., Kabishev, A.A., Lukyanov, E.V. y Bayev, A.A. (1988) *Gene*, **67**, 213-221
- Koshy, K.M. y Boggs, J.M. (1983) *Chem. Phys. Lipids*, **34**, 41-53
- Kumamoto, C.A. (1991) *Mol. Microbiol.*, **5**, 19-22
- Kusters, R., De Vrije, T., Breukink, E. y De Kruijff, B. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 20827-20830
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Barbero, J.L., Mancheño, J.M., Gasset, M., Oñaderra, M., López Otín, C., Ortega, S., García, J.L. y Gavilanes, J.G. (1994) *Gene*, **142**, 147-151

- Lakey, J.H., Van der Goot, F.G. y Pattus, F. (1994) *Toxicology*, **87**, 85-108
- Lakowicz, J.R. (1991) *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Publishing, New York
- Lamb, F.I., Roberts, L.M. y Lord, J.M. (1985) *Eur. J. Biochem.*, **148**, 265-270
- Lambert, J.M., Blättler, W.A., McIntyre, G.D., Goldmacher, V.S. y Scott Jr., C.F. (1986) *Canc. Treat. Res.*, **37**, 141-159
- Lampe, P.D. y Nelsestuen, G.L. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **693**, 320-325
- Lampe, P.D., Wei, G.J. y Nelsestuen, G.L. (1983) *Biochemistry*, **22**, 1594-1599
- Lamy, B. y Davies, J. (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1001-1006
- Laskey, R.A. y Earnshaw, W.C. (1980) *Nature*, **286**, 763-767
- Lear, J.D. y DeGrado, W.F. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 6500-6505
- Lee, C. y cols. (1989) *J. Bacteriol.*, **171**, 4609-4616
- Lee, S., Aoki, R., Oishi, O., Aoyagi, H. y Yamasaki, N. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1103**, 157-162
- Lentz, B.R., Barenholz, Y. y Thompson, T.E. (1976) *Biochemistry*, **20**, 4521-4528
- Lessnick, S.L., Bruce, C., Baldwin, R.L., Chang, M.P., Nakamura, L.T. y Winieski, B.J. (1990) *Science*, **250**, 836-838
- Li, J., Carroll, J. y Ellar, D.J. (1991) *Nature*, **353**, 815-821
- Lins, L., Brasseur, R., Rosseneu, M., Yang, C.Y., Sparrow, D.A., Sparrow, J.T., Gotto, A.M. Jr. y Ruysschaert, J.M. (1994) *J. Prot. Chem.*, **13**, 77-88
- London, E. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1113**, 25-51
- López-Mayorga, O y Freire, E. (1987) *Biophys. Chem.*, **87**, 87-96
- López-Otín, C., Barber, D., Fernández-Luna, J.L., Soriano, F. y Méndez, E. (1984) *Eur. J. Biochem.*, **143**, 621-634
- Lord, J.M., Hartley, M.R. y Roberts, L.M. (1991) *Sem. Cell Biol.*, **2**, 15-22
- Lord, J.M., Roberts, L.M. y Robertus, J.D. (1994) *FASEB J.*, **8**, 201-208
- MacDonald, R.C. (1990) *Hepatology*, **12**, 56-60
- Madshus, I.H. y Collier, R.J. (1989) *Infect. Immun.*, **57**, 1873-1878
- Marra, J. y Israelachvili, J. (1985) *Biochemistry*, **24**, 4608-4618
- Martin, I., Defrise-Quertain, F., Decroly, E., Saermark, T., Vandenbranden, M., Brasseur, R. y Ruysschaert, J.M. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1145**, 124-135
- Martin, J., Langer, T., Boteva, R., Schramel, A., Horwich, A.L. y Hartl, F-U. (1991) *Nature*, **352**, 36-42
- Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **953**, 280-288
- Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1989) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **34**, 416-422
- Mayer, L.D., Hope, M.J., Cullis, P.R. y Janoff, A.S. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, **817**, 193-196
- Mayer, L.D., Hope, M.J. y Cullis, P.R. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **858**, 161-168
- McIntosh, T.J., Ting-Beall, H.P. y Zampighi, G. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **685**, 51-60
- McIntosh, T.J. y Simon, S.A. (1986) *Biochemistry*, **25**, 4058-4066
- Mekalanos, J.J., Swarth, D.J., Pearson, G.D.N., Harford, N., Groyne, F. y de Wilde, M. (1983) *Nature*, **306**, 551-557
- Menéndez Arias, L. y Rodríguez, R. (1990) *CABIOS*, **6**, 101-105
- Merutka, G. y Stellwagen, E. (1989) *Biochemistry*, **28**, 352-357
- Meyer, D. (1988) *Trends Biochem. Sci.*, **13**, 471-474
- Misna, D., Monzingo, A.F., Katzin, B.J., Ernst, S. y Robertus, J.D. (1993) *Prot. Sci.*, **2**, 429-435

- Montecucco, C., Schiavo, G. y Tomasi, M. (1985) *Biochem. J.*, **231**, 123-128
- Montecucco, C. (1988) *Methods Enzymol.*, **165**, 347-356
- Montecucco, C., Papini, E. y Schiavo, G. (1991) en *Sourcebook of Bacterial Protein Toxins* (Alouf, J.E., y Freer, J.H., Eds.); pp. 45-56. Academic Press, London
- Montelione, G.T. y Scheraga, H.A. (1989) *Acc. Chem. Res.*, **22**, 70-76
- Montfort, W., Villafranca, J.E., Monzingo, A.F., Ernst, S., Katzin, B., Rutenber, E., Xuong, N.H., Hamlin, R. y Robertus, J.D. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 5398-5403
- Monzingo, A.F. y Robertus, J.D. (1992) *J. Mol. Biol.*, **227**, 1136-1145
- Moser, M., Crameri, R., Menz, G., Schneider, T., Dudler, T., Virchow, C., Gmachl, M., Blaser, K. y Stuer, M. (1992) *J. Immunol.*, **149**, 454-460
- Moskaug, J.O., Sandvig, K. y Olsnes, S. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 10339-10345
- Muga, A., Mantsch, H.H. y Surewicz, W.K. (1991) *Biochemistry*, **30**, 7219-7224
- Munro, S. y Pelham, H.R. (1987) *Cell*, **48**, 899-907
- Muñoz, A., Castrillo, J.L. y Carrasco, L. (1985) *Virology*, **146**, 203-212
- Murata, M., Takahashi, S., Kagiwaga, S., Suzuki, A. y Ohnishi, S. (1992) *Biochemistry*, **31**, 1986-1992
- Murphy, K.P., Bhakuni, V., Xie, D. y Freire, E. (1992) *J. Mol. Biol.*, **227**, 293-306
- Murphy, K.P. y Freire, E. (1992) *Adv. Prot. Chem.*, **43**, 313-361
- Nakamura, K.T., Iwahashi, K., Yamamoto, Y., Iitaka, Y., Yoshida, N. y Mitsui, Y. (1982) *Nature*, **299**, 564-566
- Narayanan, U., Keiderling, T.A., Bonora, G.M. y Toniolo, C. (1986) *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2431-2437
- Nelstuen, G.L. y Lim, T.K. (1977) *Biochemistry*, **16**, 4164-4171
- Nelson, J.W. y Kallenbach, N.R. (1986) *Proteins*, **1**, 211-217
- Nir, S. y Bentz, J. (1978) *J. Colloids Interface Sci.*, **65**, 399-414
- Nir, S., Bentz, J., Wilschut, J. y Düzgünes, N. (1983) *Prog. Surface Sci.*, **13**, 1-124
- Nonaka, T., Nakamura, K.T., Uesugi, S., Ikehara, M., Irie, M. y Mitsui, Y. (1993) *Biochemistry*, **32**, 11825-11837
- Ogata, M., Chaudhary, V.K., Pastan, I. y FitzGerald, D.J. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 20678-20685
- O'Hare, M., Brown, A.N., Hussain, K., Gebhardt, A. y Watson, G. (1990) *FEBS Lett.*, **273**, 200-204
- Oka, T., Natori, Y., Tanaka, S., Tsurugi, K. y Endo, Y. (1990) *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1897
- Oka, T., Aoyama, Y., Natori, Y., Katano, T. y Endo, Y. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1130**, 182-188
- Olsnes, S. y Pihl, A. (1972a) *FEBS Lett.*, **20**, 327-329
- Olsnes, S. y Pihl, A. (1972b) *Nature*, **238**, 459-461
- Olsnes, S., van Deurs, B. y Sandvig, K. (1993) *Med. Microbiol. Immunol.*, **182**, 51-61
- Olson, B.H. y Goerner, G.L. (1965) *Appl. Microbiol.*, **13**, 314-321
- Olson, B.H., Jennings, J.C., Roga, V., Juneck, A.J. y Schuurmans, D.M. (1965) *Appl. Microbiol.*, **13**, 322-326
- Oñaderra, M., Gasset, M., Martínez del Pozo, A. y Gavilanes, J.G. (1989) *Biochem. Soc. Trans.*, **17**, 999-1000
- Oñaderra, M., Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Schiavo, G.P., Martínez del Pozo, A. y Gavilanes, J.G. (1993) *Biochem. J.* **295**, 221-225
- Oobatake, M., Takahashi, K. y Ooi, T. (1979) *J. Biochem. (Tokyo)*, **86**, 65-70
- Otero, M.J. y Carrasco, L. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **134**, 453-460
- Otero, M.J. y Carrasco, L. (1987) *Virology*, **160**, 75-80

- Otero, M.J. y Carrasco, L. (1987) *Exp. Cell Res.*, **169**, 531-542
- Otero, M.J. y Carrasco, L. (1988) *Exp. Cell Res.*, **177**, 154-161
- Pace, C.N. (1975) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **3**, 1-43
- Pace, C.N. y Grimsley, G.R. (1988) *Biochemistry*, **27**, 3242-3246
- Pace, C.N., Heinemann, U., Hahn, U. y Saenger, W. (1991) *Angew. Chem.* **30**, 343-360
- Pagès, J.M., Anba, J., Bernadac, A., Shinagawa, H., Nakata, A. y Lazdunski, C. (1984) *Eur. J. Biochem.*, **143**, 499-505
- Papini, E., Sadonà, D., Rappuoli, R. y Montecucco, C. (1988) *EMBO J.*, **7**, 3353-3359
- Parente, R.A., Nir, S. y Szoka, F.C., Jr. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 4724-4730
- Parente, R.A., Nir, S. y Szoka, F.C. (1990) *Biochemistry*, **29**, 8720-8728
- Parker, M.W., Pattus, F., Tucker, A.D. y Tsemoglou, D. (1989) *Nature*, **337**, 93-96
- Parker, M.W., Tucker, A.D., Tsemoglou, D. y Pattus, F. (1990) *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 126-129
- Parker, M.W. y Pattus, F. (1993) *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 391-395
- Pastan, I., Chaudhary, V. y FitzGerald, D.J. (1992) *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 331-354
- Pelham, H.R.B., Roberts, L.M. y Lord, J.M. (1992) *Trends Cell Biol.*, **2**, 183-185
- Perczel, A., Hollòsi, M., Tusnády, G. y Fasman, G.D. (1991) *Prot. Eng.*, **4**, 669-679
- Pheil, W., Bychkova, V.E. y Ptitsyn, O.B. (1986) *FEBS Lett.*, **198**, 287-291
- Plaza del Pino, I.M., Pace, C.N. y Freire, E. (1992) *Biochemistry*, **31**, 11196-11202
- Prendergast, F.G., Haugland, R.P. y Callahan, P.J. (1981) *Biochemistry*, **20**, 7333-7338
- Privalov, P. (1979) *Adv. Prot. Chem.*, **33**, 167-240
- Privalov, P. y Potekhin, S.A. (1986) *Methods Enzymol.*, **131**, 4-51
- Ptitsyn, O.B. (1987) *J. Prot. Chem.*, **6**, 273-293
- Rafalsky, M., Ortíz, A., Rockwell, A., van Ginkel, L.C., DeGrado, W. y Wilschut, J. (1991) *Biochemistry*, **30**, 10211-10220
- Ramalingam, T.S., Das, P.K. y Podder, S.K. (1993) *Biopolymers*, **21**, 1687-1694
- Ramalingam, T.S., Das, P.K. y Podder, S.K. (1994) *Biochemistry*, **33**, 12247-12254
- Ramsay, G., Prabhu, R. y Freire, E. (1986) *Biochemistry*, **25**, 2265-2270
- Rand, R.P. (1981) *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **10**, 277-314
- Rand, R.P., Fuller, N., Parsegian, V.A. y Rau, D.C. (1988) *Biochemistry*, **27**, 7711-7722
- Randall, L.L. y Hardy, S.J.S. (1986) *Cell*, **46**, 921-928
- Rapaport, D., Hague, G.R., Pouny, Y. y Shai, Y. (1993) *Biochemistry*, **32**, 3291-3297
- Rapaport, D. y Shai, Y. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 15124-15131
- Ready, M.P., Brown, D.T. y Robertus, J.D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 5053-5056
- Refsnes, K., Kaylett, T., Sandvig, K. y Olsnes, S. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 1176-1183
- Reisbig, R., Olsnes, S. y Eiklid, K. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 8739-8744
- Richardson, P.T., Gilmartin, P., Colman, A., Roberts, L.M. y Lord, J.M. (1988a) *Bio-Technology*, **6**, 565-570
- Richardson, P.T., Roberts, L.M., Gould, J.H. y Lord, J.M. (1988b) *Biochim. Biophys. Acta*, **950**, 385-394
- Richardson, P.T., Westby, M., Roberts, L.M., Gould, J.H., Colman, A. y Lord, J.M. (1989) *FEBS Lett.*, **255**, 15-20
- Rietveld, A., Jordi, W. y de Kruij, B. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 3846-3856
- Roga, V., Hedeman, L.P. y Olson, B.H. (1971) *Cancer Chemoter.*, **55**, 101-113
- Rothmann, J.E. y Kornberg, R.D. (1986) *Nature*, **322**, 209-210
- Roux, M., Nezil, F.A., Monck, M. y Bloom, M. (1994) *Biochemistry*, **33**, 307-311
- Rutenber, E., Katzin, B.J., Collins, E.J. y Robertus, J.D. (1991) *Proteins: Struc. Funct.*

- Genet.*, **10**, 240-250
- Rutenber, E. y Robertus, J.D. (1991) *Proteins: Struc. Funct. Genet.*, **10**, 260-269
- Sacco, G., Drickamer, K. y Wool, I.G. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 5811-5818
- Saier, M.H., Werner, P.K. y Müller, M. (1989) *Microbiol. Rev.*, **53**, 333-366
- Sandvig, K. y Olsnes, S. (1980) *J. Cell. Biol.*, **87**, 828-832
- Sandvig, K. y Olsnes, S. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 9068-9076
- Sandvig, K. y Olsnes, S. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 12352-12359
- Sandvig, K., Prydz, K., Hansen, S.H. y van Deurs, B. (1991) *J. Cell. Biol.*, **115**, 971-981
- Sandvig, K., Garred, O., Prydz, K., Kozlov, J.V., Hansen, S.H. y van Deurs, B. (1992) *Nature*, **358**, 510-511
- Sandvig, K. y van Deurs, B. (1994) *FEBS Lett.*, **346**, 99-102
- Sato, S. y Uchida, T. (1975) *Biochem. J.*, **145**, 353-360
- Schatz, G. (1986) *Nature*, **321**, 108-109
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., de Laureto, P.P., GasGupta, B.R. y Montecucco, C. (1992) *Nature*, **359**, 832-835
- Schindler, D.G. y Davies, J.E. (1977) *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1097-1110
- Schleyer, M. y Neupert, W. (1985) *Cell*, **43**, 339-350
- Sedzik, J., Blaurock, A.E. y Hochli, M. (1984) *J. Mol. Biol.*, **174**, 385-409
- Seshadri, S., Oberg, K.A. y Fink, A.L. (1994) *Biochemistry*, **33**, 1351-1355
- Shlyapnikov, S.V., Kulikov, V.A. y Yakovlev, G.I. (1984) *FEBS Lett.*, **177**, 246-248
- Shortle, D. (1993) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **3**, 66-74
- Sieggall, C.B., Chaudhary, V.K., FitzGerald, V.K. y Pastan, D.J. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 14256-14261
- Slater, S.J., Ho, C., Taddeo, F.J., Kelly, M.B. y Stubbs, C.D. (1993) *Biochemistry*, **32**, 3714-3721
- Sönnichsen, F.D., Van Eyk, J.E., Hodges, R.S. y Sykes, B.D. (1992) *Biochemistry*, **31**, 8790-8798
- Spicer, E.K. y Noble, L.A. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 5716-5721
- Stegmann, T. y Helenius, A. (1993) en *Viral Fusion Mechanisms* (Bentz, J., Ed.); pp. 89-111. CRC Press, Boca Raton, FL
- Stirpe, F., Olsnes, S. y Pihl, A. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 6947-6953
- Stirpe, F., Sandvig, K., Olsnes, S. y Pihl, A. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 13271-13277
- Stirpe, F., Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Falasca, A., Abbondanza, A. y Stevens, W.A. (1983) *Biochem. J.*, **216**, 617-625
- Stirpe, F., Barbieri, L., Abbondanza, A., Falasca, I.A., Brown, A.N.F., Sandvig, K., Olsnes, S. y Pihl, A. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 14589-14595
- Stirpe, F., Barbieri, L., Batelli, M.G., Soria, A. y Lappi, D.A. (1992) *Biotechnology*, **10**, 405-412
- Stollery, J.G. y Vail, W.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **471**, 372-390
- Struck, D., Hoekstra, D. y Pagano, R.G. (1981) *Biochemistry*, **20**, 4093-4099
- Sturtevant, J.M. (1987) *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **38**, 463-488
- Surewicz, W.K., Epand, R.M., Vail, W.J. y Moscarello, M.A. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, **820**, 319-323
- Surewicz, W.K., Szabo, A.G. y Mantsch, H.H. (1987) *Eur. J. Biochem.*, **167**, 519-523
- Surewicz, W.K. y Mantsch, H.H. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **952**, 115-130
- Surewicz, W.K., Leddy, J.J. y Mantsch, H.H. (1990) *Biochemistry*, **29**, 8106-8111
- Surewicz, W.K., Mantsch, H.H. y Chapman, D. (1993) *Biochemistry*, **32**, 389-394
- Szoka, F.C. (1987) en *Cell Fusion* (Sowers, A.E., Ed.); pp. 209-240. Plenum Press, New

York

- Takahashi, K. (1985) *J. Biochem.*, **98**, 815-817
- Takahashi, K. y Hashimoto, J. (1988) *J. Biochem.*, **103**, 313-320
- Tanford, C. (1980) en: *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*, Wiley, New York.
- Teissie, J., Rats, M., LeMassu, A., Stewart, L.C. y Kates, M. (1990) *Biochemistry*, **29**, 59-65
- Tomasi, M. y Montecucco, C. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 11177-11181
- Turnay, F.J., Olmo, N., Jiménez, A., Lizarbe, M.A. y Gavilanes, J.G. (1993) *Mol. Cell. Biochem.* **122**, 39-47
- Uchida, T. (1982) en: *Molecular Action of Toxins and Viruses* (Cohen, E. y Van Heyningen, S. Eds.); pp. 1-31. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam
- Uemura, A., Kimura, S. y Imanishi, Y. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **729**, 28-34
- Utsugi, T., Schroit, A.J., Connor, J., Bucana, C. y Friedler, I.J. (1991) *Cancer Res.*, **51**, 3062-3066
- van der Goot, F.G., González Mañas, J.M., Lakey, J.H. y Pattus, F. (1991) *Nature*, **354**, 408-410
- van Deurs, B., Hansen, S.H., Olsnes, S. y Sandvig, K. (1993) en *Biological Barriers to Protein Delivery* (Audus, K.L. y Raub, T.J. Eds.); pp. 71-104. Plenum, New York
- Vassilyev, D.G., Katayanagi, K., Ishikawa, K., Tusjimoto-Hirano, M., Danno, M., Pahler, A., Matsumoto, O., Matsushima, M., Yoshida, H. y Morikawa, K. (1993) *J. Mol. Biol.*, **230**, 979-996
- Verner, K. y Schatz, G. (1988) *Science*, **241**, 1307-1313
- Vestweber, D. y Schatz, G. (1988) *J. Cell. Biol.*, **107**, 2037-2043
- Vestweber, D., Brunner, J., Baker, A. y Schatz, G. (1989) *Nature*, **341**, 205-209
- Vitteta, E.S. y Yen, N. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1049**, 151-157
- von Heijne, G. y Blomberg, C. (1979) *Eur. J. Biochem.*, **97**, 175-181
- Walker, T.A., Endo, Y., Wheat, W.H., Wool, I. y Pace, N.R. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 333-338
- Walter, P., Gilmore, R. y Blobel, G. (1984) *Cell*, **38**, 5-8
- Walter, A. y Siegel, D.P. (1993) *Biochemistry*, **32**, 3271-3281
- Wang, Y., Quian, R.Q., Gu, Z.W., Jin, S.W., Zhang, L.Q., Xia, Z.X., Tian, G.Y. y Ni, C.Z. (1986) *Pure Appl. Chem.*, **58**, 789-798
- Watanabe, H., Ohghi, K. y Irie, M. (1982) *J. Biochem.*, **91**, 1495-1509
- Wawrzynczak, E.J., Henry, R.V., Cunber, A.J., Parnell, G.D., Derbyshire, E.J. y Ulbrich, N. (1991) *Eur. J. Biochem.*, **196**, 203-209
- Wei, G.J., Bloomfield, V.A., Resnick, R.M. y Nelsestuen, G.L. (1982) *Biochemistry*, **21**, 1949-1959
- Wharton, S.A., Martin, S.R., Ruigrok, R.H., Skehel, J.J. y Wiley, D.C. (1988) *J. Gen. Vir.*, **69**, 1847-1857
- White, J.M. (1992) *Science*, **258**, 917-924
- Wickner, W. (1979) *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 23-45
- Wilschut, J. y Hoekstra, D. (1984) *Trends Biochem Sci.*, **9**, 479-483
- Wilschut, J., Nir, S., Scholma, J. y Hoekstra, D. (1985) *Biochemistry*, **24**, 4630-4636
- Wilschut, J. y Hoekstra, D. (1986) *Chem. Phys. Lipids*, **40**, 145-166
- Wilschut, J. (1991) en *Membrane Fusion* (Wilschut, J. y Hoekstra, D. Eds.); pp. 89-125. Marcel Dekker, New York.
- Wilschut, J. y Bron, R. (1993) en *Viral Fusion Mechanisms* (Bentz, J., Ed.); pp. 133-161.

- CRC Press, Boca Raton, FL
- Wilson, B.A., Blanke, S.R., Murphy, J.R., Pappenheimer, A.M., Jr. y Collier, R.J. (1990) *Science*, **250**, 834-836
- Wool, I. (1984) *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 14-17
- Wool, I., G., Endo, Y., Chan, Y.L. y Gluck, A. (1990) en *The ribosome, structure, function and evolution* (H. E. Hill, A. Dahlber, R.A. Garret, P.B. Moore, D. Schlessinger, J.R. Warner, Eds); pp. 203-214. American Society of Microbiology, Washington DC.
- Wool, I.G., Glück, A. y Endo, Y. (1992) *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 266-269
- Xie, D., Bhakuni, V. y Freire, E. (1991) *Biochemistry*, **30**, 10673-10678
- Yeung, H.W., Li, W.W., Feng, Z., Barbieri, L. y Stirpe, F. (1988) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **31**, 265-268
- Yoshida, T., Chen C., Zhang, M. y Wu, H.C. (1991) *Exp. Cell. Res.*, **192**, 389-395
- Yoshimura, T., Goto, Y. y Aimoto, S. (1993) *Biochemistry*, **31**, 6119-6126
- Yu, Y., Makhatadze, G.I., Pace, C.N. y Privalov, P. (1994) *Biochemistry*, **33**, 3312-3319
- Zachowski, A. (1993) *Biochem. J.*, **294**, 1-14
- Zalman, L.S. y Wisnieski, B.J. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3341-3345
- Zardeneta, G., y Horowitz, P.M. (1993) *Biochemistry*, **32**, 13941-13948
- Zhao, J.M. y London, E. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2002-2006
- Zimmerberg, J., Vogel, S.S. y Chernomordik, L.V. (1993) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **22**:433-466
- Zimmermann, R. y Meyer, D.I. (1986) *Trends Biochem. Sci.*, **11**, 512-515